Vol. 10 1939

# ARQUIVOS

DO

# INSTITUTO BIOLOGICO





SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

*Os Arquivos do Instituto Biologico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.*

*Os artigos separados, impressos em numero limitado, são obtidos apenas por permuta.*

*Toda correspondencia referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor do Instituto Biologico, Caixa Postal 2821, São Paulo, Brasil.*

---

*Diretor - Prof. Dr. H. da Rocha Lima*

---

*The "Arquivos do Instituto Biologico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.*

*The separate articles, a limited number of which is printed, may be obtained by exchange.*

*All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor do Instituto Biologico, P. O. Box 2821 - São Paulo, Brazil.*

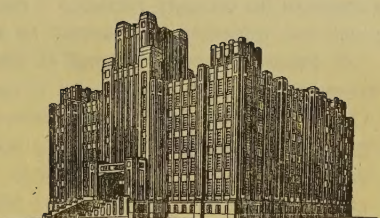
PREÇO DESTE NUMERO 20$000

Vol. 10 1939

# ARQUIVOS

DO

# INSTITUTO BIOLOGICO



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

# SUMARIO



(CONTINÚA)

(CONTINÚA)

o



RODOLPHO von IHERING
Chefe da Secção de Zoologia
do Instituto Biologico de S. Paulo,
em comissão no Ministerio de Agricultura como Chefe
do Serviço de Piscicultura.
Nascido em 17 de Julho de 1883 no Rio Grande do Sul.
Falecido em 15 de Setembro de 1939 em São Paulo.
Filho do eminente naturalista, diretor do Museu Paulista, Hermann von Ihering e neto do grande jurisconsulto alemão, Rudolf von Ihering.

*Em sessão realisada em 24 de Novembro no Instituto Biologico em homenagem á sua memoria foi a sua personalidade e sua obra objeto de demorada apreciação por parte de seus colegas e colaboradores. O seu necrologio será publicado na Revista do Museu Paulista de Zoologia.*

Vol. 10 — Art. 1 Agosto de 1939

# ESTUDOS SOBRE A "MANQUEIRA"
## ETIOLOGIA - DIAGNOSTICO

POR

C. Rodrigues

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Sendo a «manqueira» (*) uma doença do campo, que ataca bovinos em liberdade e os abate rapidamente, é frequente o encontro das carcassas pelos campos, longo tempo depois da morte, principalmente entre nós e, de um modo geral, nos países de criação extensiva, onde não é comum o habito de reunir o gado com frequencia, para contagem e inspeção.

A etiologia desta doença é ainda discutida, por motivos que logo exporemos em detalhes, mas avoluma-se a convicção de ser o *Clostridium chauvoei* o seu unico causador. Sabendo-se que a vacinação é o unico meio seguro e eficiente de que dispomos para combater a infecção por este germen, é compreensivel o enorme interesse profilactico que apresenta a elucidação definitiva desta questão, de ser a manqueira causada unica e exclusivamente pelo *Clostridium chauvoei*, ou tambem por outros anaerobios da gangrena.

Conforme é geralmente observado, e especialmente frizado por KARMAN em 1930, o aspéto clinico da doença não é bastante especifico para nele se apoiar o diagnostico; é entretanto suficientemente caracterizado para que ele fique bem circunscrito. Mas o fato de passar a evolução dos sintomas muitas vezes despercebida, não nos deixa senão a oportunidade de examinar carcassas mais ou menos putrefeitas, onde as lesões que caracterizam o quadro clinico e de autopsia já foram parcial ou totalmente mascaradas pelo progresso da decomposição. Neste momento e nessas condições, evidentemente, só o exame em laboratorio microbiologico fornece meios diagnosticos suficientes, e portanto é sempre desejavel que o diagnostico da manqueira seja feito ou confirmado pelo laboratorio.

Este exame microbiologico, deve esclarecer, qual ou quais os agentes infecciosos presentes; e sendo o *Clostridium chauvoei*, dentre os anaerobios causadores de gangrena, um dos mais delicados e fastidiosos, é natural que um exame cuidadoso deve ser pautado pelas condições necessarias ao reconhecimento desse germen, o que implica forçosamente condições para o reconhecimento dos demais. Por isso,

(*) «Manqueira» é a denominação usual no Brasil, para a doença de bovinos novos que em outras regiões se denomina «Charbon symptomatique» (Fr.), «Black-leg» (Ing.), «Rauschbrand» (Al.), «Mancha», (Arg.), etc. Todos esses termos devem ser considerados sinonimos.

mesmo partindo de um ponto de vista objetivo, o exame diagnostico, em laboratorio, de material suspeito de manqueira visa sempre especialmente o *Clostridium chauvoei*.

Fatores favoraveis e desfavoraveis influem grandemente na tecnica dos exames necessarios para esse diagnostico; como fator desfavoravel, além da condição especial de anaerobio estricto e culturalmente exigente, do *Cl. chauvoei*, ha a extrema contaminação do material a examinar, dada a possibilidade de existirem, entre os contaminantes, outros anaerobios causadores de gangrena e, possivelmente, tambem de manqueira, os quaes são habitantes normaes da terra. Estes, frequentemente presentes no intestino da vitima, si por um lado são capazes de ocorrer como fatores etiologicos de gangrenas, dando um quadro clinico muito semelhante ao da manqueira por *Cl. chauvoei*, por outro lado podem aparecer nesta doença como invasores secundarios, sem significação etiologica.

Como fator favoravel, unico mas valioso, ha o fato de não ser o *Cl. chauvoei* encontrado normalmente na terra, conforme se verifica das pesquisas de ZEISSLER & RASSFELD, 1928, e das de SASAKI, 1934, e tão pouco nos organs de animais mortos por outra causa que não a manqueira. Assim, torna-se tacitamente admissivel a influencia etiologica do *Cl. chauvoei*, pela simples verificação da presença deste germen no material infectado. Esta regra tem talvez exceções, mas satisfaz á grande maioria dos casos.

Entretanto, é frequente deparar-se material contendo varias especies de anaerobios da gangrena, entre os quais tambem o *Cl. chauvoei*; torna-se então necessario o emprego de tecnicas que sejam capazes de permitir o reconhecimento e isolamento deste, tecnicas que visem portanto criar condições de equilibrio que neutralizem a maior vitalidade natural dos demais.

Assim, a rotina diagnostica do exame de material suspeito obedece sempre ao mesmo intuito geral, isto é, afastar do material em estudo todas as especies aerobias e anaerobias apatogenicas, e distinguir e separar cada uma das especies anaerobias patogenicas. Para chegar a esse resultado, têm-se empregado esforços em varios sentidos, resultando em metodos que preenchem uma ou ambas dessas condições, embora muitas vezes apenas parcialmente.

Esses metodos, aqui encarados sobretudo em relação ao *Cl. chauvoei*, mas que, como se verá, não impedem o reconhecimento dos demais anaerobios causadores de gangrena, formam o arcabouço obrigatorio de qualquer rotina diagnostica, na esfera que nos interessa.

As pesquisas aqui referidas, procurando analisar a ocorrencia dos diversos anaerobios da gangrena em casos autoctones de man-

queira, e a sua provavel influencia etiologica, dizem respeito essencialmente ás diversas maneiras de combinar os diferentes processos de exame, e aos resultados praticos destas combinações na rotina diagnostica, com ligeiras considerações sobre outros fatores, circunstanciais, que tambem têm influencia nessa rotina.

* * *

Podem ser divididos em 4 classes principais os metodos que têm sido propostos e aplicados no diagnostico da manqueira:

A) Subsidiarios:
  I — Agentes quimicos de função selectora;
  II — Agentes fisicos de função selectora (calor).

B) Integrais:
  III — Cultura sob a forma de colonias isoladas;
  IV — Inoculação em animais sensiveis de laboratorio.

Com exceção do 1.º, estes metodos foram objeto das experiencias em que se baseia este estudo. Vamos fazer deles uma rapida resenha:

I — Substancias selectoras: — A junção a meios liquidos de cultura, de agentes quimicos de ação impediente selectiva, tem sido de ha muito considerada. Para isso foi experimentada uma série de substancias bacteriostaticas, a mais interessante das quais é o fenol, estudado em detalhe por Scott em 1928. Este metodo, que não logrou popularidade, pode ser catalogado como primario, no sentido em que visa apenas o afastamento de uma série de contaminantes, e não todos. O fenol, p. ex., parece ter uma ação selectiva, principalmente sobre bacterias aerobias.

II — Aquecimento: — Este outro metodo, tambem primario, tira proveito da faculdade dos anaerobios da gangrena, de formarem esporos tanto nos meios de cultura como no corpo animal, e da resistencia desses esporos ao aquecimento. Esta, variavel conforme as condições ambientes, em relação ao *Cl. chauvoei* foi verificada por Zeissler & Rassfeld em 1928, ser de 2′ a 12′ a 100º C, para a cultura em papa de cerebro conforme Hibler; a cultura esporulada e dessecada em fios de seda, resiste de 38′ a 48′, conforme Apfelbeck, 1922, e o musculo dessecado de animais infectados, 7 horas ao calor sêco de 104º C (Leclainche & Vallée, 1900). Por isso, tem-se usado largamente aquecer o material de pesquisa, previamente ao exame.

E' de notar, entretanto, que esse aquecimento apenas elimina os germens não esporulados, pois, pelo menos dentre os anaerobios esporulados, o esporo do *Clostridium chauvoei* é, em identicas condi-

ções, um dos mais sensiveis ao calor, o que se vê bem das tabelas apresentadas por Zeissiler & Rassfeld, 1928. Demais, é de notar que, nas condições usuais de exame, partindo de musculo ou serosidade, sêcos ou não, a resistencia dos esporos do *Clostridium chauvoei* é muito variavel, o que torna dificil, nos exames de rotina, a estandardização do tempo e da temperatura. Assim, o aquecimento a 65° C durante 20', de musculo e serosidade do mesmo animal, feitos comparativamente por Leclainche & Vallée em 1900, mostra que aquele se mantem sempre vital, e esta ora sim, ora não. Observações feitas por Rottgardt em 1932, determinam que a causa provavel desse fato é a esporulação parca nos cadaveres, e aí, apenas nas massas musculares alteradas, não nos organs internos.

III — Isolamento de colonias em placa: — Dado o largo uso e utilidade das semeaduras na superficie de meios solidos, para o isolamento e identificação das bacterias aerobias, era natural que muitos esforços fossem expendidos para aplicar o metodo tambem aos anaerobios. As grandes dificuldades naturais desta adaptação fizeram surgir a principio o metodo de compromisso, de cultura na massa de meios solidos, o qual resolvia a questão do isolamento de uma maneira proximamente satisfatoria. Este processo apresentava entretanto as seguintes ponderaveis desvantagens: necessidade de se usar um meio de cultura transparente; impossibilidade de aplica-lo a germens energicos produtores de gaz, que arrebentando a coluna de meio não mantinham a necessaria situação de isolamento; dificuldade de retirada das colonias desejadas, em estado de pureza; e pequena diferenciação das colonias dos diversos germens, entre si. Apezar disso, o metodo teve larga aplicação, e foi baseados no uso do tubo de Veillon, agar glicosado a 0.2 %, nitratado a 0.2 %, cultura na massa, que Weinberg e colaboradores levaram a efeito todo o seu monumental trabalho sobre a flora anaerobia da gangrena, executado durante o periodo 1914-18, e do qual resultou o descobrimento de varias novas especies, assim como a caracterização exata e sistematica de todos os componentes do complexo que constituem as gangrenas de guerra.

Entretanto, para o diagnostico da manqueira a aplicação deste sistema não ofereceu resultados tão brilhantes, tendo sido mesmo raro seu uso, o que aliás tem sua explicação no fato de ser o *Clostridium chauvoei* um germen exigente, de crescimento pobre em agar, mesmo glicosado, a ponto de ser a ausencia de crescimento nesses meios admitida por alguns como carater diferencial e até importante. A junção de sôro de cavalo ao meio, que tornou possivel a Rocha Lima em 1905 a primeira demonstração do *Cl. chauvoei* como causa da man-

queira no Brasil, e a Gomes de Faria em 1908 aplica-lo em pequena escala, não bastou entretanto, para difundir o seu emprego como meio de rotina.

De 1917 para cá, todavia, com os estudos colateraes de Zeissler, na Alemanha, e da Comissão Britanica para o estudo das gangrenas de guerra, o problema da cultura sobre superficie de meio solido, em placa, foi praticamente resolvido e desde então o uso de placas de agar sangue, glicosado, conforme manda Zeissler, ou não glicosado, segundo Fortner, e em menor escala o agar sôro, aconselhado pela Comissão Britanica, fazem parte da rotina habitual dos laboratorios que estudam anaerobios. Zeissler chegou, com o seu processo, ao ponto de determinar os sinais caracteristicos das colonias de cada uma das especies mais importantes, colocando assim o uso das culturas de anaerobios na superficie de meios solidos em situação paralela ao das de aerobios. E' desnecessario ressaltar a importancia pratica dessas aquisições.

Comtudo, duas questões continúam ainda abertas, a nosso ver, no emprego da placa de Zeissler ou da de Fortner, no diagnostico de manqueira. Uma delas diz respeito á especificidade e á regularidade da forma de colonia dada como caracteristica do *Cl. chauvoei.* A outra se relaciona com o momento do emprego da placa na sequencia diagnostica.

Assim, Wolters & Dehmel, em 1928, declaram encontrar nas colonias do *Clostridium chauvoei* formas variantes, e ás vezes crescimento muito parco. Tambem Karmann observa, em 1930, que o crescimento desta especie é ás vezes irregular. Meissner & Schoop, no mesmo ano, citam Zeller & Goerttler que encontraram ocasionalmente formas de colonia atipicas, em placa de Zeissler, e dizem ter nisso grande influencia tanto a pressão de oxigenio ambiente como tambem o grau de humidade da placa de cultura, influindo ainda o tipo de sangue usado. Em relação ao ultimo, aconselham de preferencia o de homem, e o de boi. Aliás, o proprio Zeissler, em sua publicação no tratado de Kolle, Kraus & Uhlenhut, edição de 1930, exalta as dificuldades inerentes ao cultivo do *Clostridium chauvoei,* e os cuidados meticulosos e essenciais que exige a obtenção do crescimento em colonia tipica. Este autor insiste tambem na tensão de oxigenio á qual deve ser submetida a cultura, nas diferenças da capacidade solidificadora de diversas partidas de agar-agar, e na necessidade imprescindivel do uso de sangue humano ou bovino.

Formas anomalas de crescimento foram tambem encontradas em placa de Fortner, conforme declara este mesmo autor em 1929; nós mesmos, em 1936, deparamos com elas, conforme acentuámos em pu-

blicação recente, o que nos levou á convicção de não se poder tomar o aspéto das colonias em placa como indice absoluto da presença, e especialmente da ausencia, do *Clostridium chauvoei.*

A respeito do momento em que se deve proceder á passagem em placa, na sequencia do exame, bem como a tecnica de seu emprego, variam um pouco as opiniões quando se considera o processo de ZEISSLER, usando sangue de homem ou de boi a 20 %, glicose a 1 %, e cultura no vacuo, e o processo de FORTNER, em que é aconselhado sangue de coelho ou de carneiro a 5 %, sem glicose adicional, e cultura em simbiose.

Assim, acerca do metodo de ZEISSLER, que se mostrou satisfatorio a RAEBIGER & SPIEGEL em 1924, e tambem a MIESSNER & SCHOOP, que em 1930 o classificam como ideal, foi por WOLTERS & DEHMEL em 1928 apresentada a critica de fornecer ás vezes crescimento pobre ou nulo do *Clostridium chauvoei.* Quanto ao metodo de FORTNER, vemos em GOIDSENHOVEN & BERTRAND, 1935, resultados satisfatorios, mesmo na cultura diréta do material a examinar. Mas estudos comparativos dos dois processos, feitos por SCHREIBER, em 1934, KLOCKER em 1932 e MIESSNER & SCHOOP, 1934, e WAKAMATSU, tambem em 1934, nem sempre deram resultados concordes.

Assim KLOCKER, confirmado por MIESSNER & SCHOOP, notou que o metodo de ZEISSLER dá muito maior indice de positividade que o de FORTNER, si fisermos semeadura diréta, do material natural. Mesmo no caso de enriquecimento previo, em caldo conforme TAROZZI, o metodo ZEISSLER ainda conserva uma pequena vantagem. WAKAMATSU infirma em parte as afirmações de KLOCKER, mas deve-se anotar que não estudou comparativamente os dois metodos, interessando-se apenas pelo de FORTNER. E SCHREIBER, em sua tése inaugural, apresenta para este metodo as seguintes vantagens: maior vitalidade das colonias, crescimento mais rapido e abundante. E' digno tambem de cogitação o menor preço das instalações exigidas.

Um inconveniente ponderavel, que o uso de placas de isolamento não conseguiu afastar, é o da possibilidade de desenvolvimento de culturas invasoras, formando induto continuo sobre toda a placa, dificultando, e muitas vezes impossibilitando o isolamento de culturas isoladas e puras. Tentativas para afastar esta causa de insucesso têm sido feitas por diversos autores, e são todas baseadas em trabalhos identicos, com o fim de afastar a contaminação das placas de aerobios por germens de crescimento expansivo.

GOIDSENHOVEN & BERTRAND em 1935 usam com exito o luminal a 4 por mil, para esse efeito. O cloral tambem tem sido usado. Já

Zeissler, quando delineou seu metodo, previu essa dificuldade, aconselhando o uso de placas parcialmente dessecadas.

IV — Inoculação em animal de laboratorio: — Uma outra tecnica de estudo baseia-se no uso de inoculação do material a examinar, em animais de laboratorio. Naturalmente seu emprego pode visar dois fins: ou diagnostico diréto, pelo exame do quadro da autopsia, ou simples enriquecimento in-vivo, previamente a outras manobras.

Utilizando-se culturas puras, pode-se sem muita dificuldade, estabelecer diferenças entre o quadro de autopsia apresentado por varios dos anaerobios causadores de gangrena, o *Clostridium chauvoei*, o *Cl. welchii*, o *Cl. novyi* e o *Cl. histolyticum*, quadros esses bem conhecidos, e classificados por Zeissler como os tipos II, I, III e VI, respetivamente. Entretanto, a diferenciação entre os quadros fornecidos pelo *Cl. chauvoei* e o *Cl. septicum* não é simples, o que levou Zeissler a considera-los no mesmo grupo II. Este autor apresenta como distintivo do *Cl. chauvoei*, o aspéto mais hemorragico do edema, no que é confirmado por Karmann em 1930. Outra diferença digna de nota, observada entre outros por Raebiger & Spiegel, 1924 e por Welsch, Marsh & Jungherr, 1928, diz respeito ao aparecimento de congestão no canal gastro-intestinal, sinal frequente na infecção pelo *Clostridium septicum*, e raro na do *Cl. chauvoei*. Entretanto, Rottgard em 1932 nota que bovinos e ovinos, inoculados experimentalmente com o *Clostridium chauvoei*, apresentam frequentemente zonas congestas, e fócos hemorragicos, tanto no intestino como na grande curvatura do estomago. Mais recentemente, contudo, D'Alessandro, em 1937, declara ser possivel reconhecer o quadro de autopsia do *Cl. chauvoei*, em comparação com o de todos os outros germens acima citados; chama a atenção para o aspéto, particular neste caso, das fibras musculares sêcas e como que cozidas, para o odor particular e para a pequena quantidade de gaz.

Tambem um carater de interesse decisivo é fornecido pelo exame dos germens presentes na superficie do peritonio, especialmente sobre o figado, os quais se colhem em sua disposição natural, por aderencia a uma lamina que se comprime contra essa superficie. Esta tecnica, introduzida por Foth, é hoje de pratica universal. Si entretanto ha acôrdo em relação á incapacidade do *Clostridium chauvoei*, de se apresentar nestas condições sob a forma de filamentos, admite-se a possibilidade de seu aparecimento em cadeias, mais ou menos longas; quanto ao *Cl. septicum*, que normalmente se apresenta em longos filamentos, tem-se ocasionalmente observado que pode dar aspétos praticamente indiferençaveis dos que se vêm normalmente no *Cl. chauvoei*. Em relação aos outros anaerobios da gangrena, o metodo

não oferece interesse, mas em relação aos agora citados, que são justamente os mais dificilmente distinguiveis por outros processos, as exceções observadas não lhe tiram seu grande valor acessorio, desde que se trate de culturas puras.

Nossa experiencia, obtida em cobaias, confirma as observações de RAEBIGER & SPIEGEL, acima citados, tanto em relação á maior predominancia de congestão no canal digestivo, nas infecções pelo *Cl. septicum,* como no ponto em que eles afirmam haver quadros intermediarios, que não conferem á autopsia mais que um valor orientador.

Vemos pois que, mesmo no caso de inoculação de culturas puras, por varios autores é admitido que o aspéto do quadro de autopsia se presta a interpretações divergentes. As cousas mudam totalmente quando se trata de material impuro, como ele se apresenta para os exames de rotina. E' facil prever a quasi inutilidade da autopsia de animais inoculados com material contaminado, ás vezes com a presença de varios anaerobios patogenicos, em todo caso com a de numerosas especies apatogenicas, que contribuem para modificar o aspéto da carcassa.

Por isso, a técnica de inoculação diagnostica em cobaia tem na rotina uma utilidade muito limitada. Seu uso como meio de enriquecimento, embora mereça oposição de ZEISSLER, parece ter sua utilidade, em se tratando do caso especial da manqueira. E' claro que, no caso de estarem presentes no material de partida varias especies patogenicas, o metodo não permite sua separação. E demais, tem sido admitida a possibilidade da ulterior contaminação do material inoculado, pela afluencia de germens anteriormente presentes no intestino dos animais de experiencia, os quais invadiram a corrente sanguinea durante o estado agonico, ou logo após a morte se disseminariam por todo o corpo, mesmo tratando-se de germens avirulentos.

No entanto, foi por BECKER demonstrado, em 1921, que é muito pouco provavel a contaminação do material inoculado, por germens do intestino do animal de experiencia, sendo em consequencia pouco provavel que se recolham deste animal germens ausentes na emulsão original. Por outro lado, nossa experiencia indica que é muitas vezes possivel obter culturas puras de *Cl. chauvoei,* por punção do coração das cobaias em agonia, mesmo quando o material inoculado é bastante impuro, desde que não contenha outro germen patogenico associado. Isto mesmo é observado por D'ALESSANDRO.

Assim pois, a mais seria razão de insucesso do metodo de enriquecimento pela inoculação em animais sensiveis, especialmente na cobaia, é a frequente presença, no material de partida, de varios anaerobios patogenicos associados. Para obviar a esse inconveniente, foi introduzida a chamada inoculação complexa, em que se usam

animais protegidos contra os varios anaerobios da gangrena, por imunização ativa ou passiva. Sendo naturalmente a vacinação muito demorada, e de resultados pouco avaliaveis, no sentido da quantidade, seria a imunização passiva o metodo mais aconselhavel para esse fim, usando-se sôros rigorosamente monovalentes, e de dosagem exata. Mas ainda aqui as dificuldades não são totalmente removidas, porque é dificil e dispendioso obter os sôros necessarios contra todas as especies patogenicas, mesmo se nos limitarmos ás cinco mais importantes, como sejam o *Cl. septicum,* o *Cl. welchii,* o *Cl. novyi,* o *Cl. histolyticum* e o *Cl. tetani.* O que entretanto torna ainda mais dificil a aplicação do processo, é a presença, no sôro normal do cavalo, animal de que habitualmente lançamos mão para o preparo de sôros, de anticorpos naturais contra o *Cl. chauvoei.* Este fato, verificado por WEINBERG & DAVESNE em 1935, explica os insucessos de WEINBERG & MIHAILESCO em 1929, e os de KRANEVELD & DJAENODIN em 1938, ainda invalidando o conselho de ROTTGARDT, 1927, de se usar sistematicamente a junção de sôro anti *Clostridium septicum* ao material a inocular.

* * *

Como se vê desta rapida revista, cada um dos sistemas descritos apresenta pois inconvenientes e imperfeições que lhe tiram valor absoluto, no isolamento dos germens e identificação da doença; é comum usar-se na rotina diagnostica uma associação de varios deles, o que embora torne mais complicado o exame, diminue ou suprime certos inconvenientes que cada sistema isoladamente apresenta.

Sendo porém aqui, no nosso serviço de rotina, os exames diagnosticos de manqueira destinados a atender a interesses praticos, sob a forma de medidas preventivas a serem aconselhadas, eles requerem como toda pesquisa de rotina um desenvolvimento simples, rapido e pouco dispendioso; torna-se portanto necessario encontrar uma posição de equilibrio entre a perfeição tecnica e a eficiencia pratica, posição que só um perfeito conhecimento dos diversos fatores de insucesso, assim como do grau de sua influencia, poderá estabelecer.

Dirigindo o Serviço de Anaerobios do Instituto Biologico, foi-nos possivel examinar até agora 44 casos suspeitos de manqueira, incluidos em material de diferentes tipos, em graus de conservação muito variados, e que foi submetido a exames tambem diversos. Na tabela 1 são apresentados os resultados obtidos, e as indicações que eles fornecem.

Os protocolos analisados referem-se a materiais provenientes de carcassas, colhidos no interior do Estado de S. Paulo por Inspetores Veterinarios, e enviados para exame ao Instituto; uma parte destes

foi enviada espontaneamente, para elucidação de diagnostico, e neste grupo estão incluidos 10 casos, cujo estudo preliminar foi efetuado no Serviço de Patologia Veterinaria, e que nos foram depois gentilmente cedidos por Dr. A. M. PENHA, a quem agradecemos; todo material colhido em duplicata, isto é, contendo musculo e osso separadamente, foi obtido por solicitação nossa, de casos com diagnostico clinico de manqueira, colhido e remetido em condições identicas.

## OCORRENCIA E PREDOMINANCIA DO "CL. CHAUVOEI"

Nos 54 exames efetuados, que se referiam a 44 casos diferentes, puderam ser identificados os seguintes germens anaerobios patogenicos, provocando gangrena:

TABELA 1

Ocorrencia de *Cl. chauvoei* e outros anaerobios em material obtido de casos clinicos de manqueira

| | |
|---|---|
| *Cl. chauvoei* . . . . . . . . . . . . | 21 |
| *Cl. chauvoei* e *Cl. septicum* . . . . . . | 5 |
| *Cl. chauvoei* e *Cl. welchii* . . . . . . . | 2 |
| *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum* e *Cl. welchii* . . | 3 |
| *Cl. septicum* . . . . . . . . . . . | 3 |
| *Cl. welchii* . . . . . . . . . . . . | 2 |
| Anaerobios patogenicos não identificados | 4 |
| Resultados negativos . . . . . . . . | 4 |
| Total dos casos examinados . . . . . | 44 |

Ressalta do resultado geral desses exames a predominancia dos isolamentos de *Clostridium chauvoei*, como unico anaerobio patogenico ou associado a outros. Assim, em tres quartos dos casos submetidos a exame, ele pôde ser verificado só, ou acompanhado de outros anaerobios da gangrena. O *Clostridium septicum* foi encontrado 11 vezes, sendo 3 vezes o unico presente. O *Clostridium welchii* 7 vezes, das quais duas sózinho. De 4 casos, embora fossem presentes inicialmente anaerobios patogenicos, como o provou a inoculação preliminar em cobaia, nada pôde ser isolado, dada a exuberante flora secundaria existente. Finalmente, 4 casos mostraram-se absolutamente negativos, isto é, o material original, dirétamente ou em cultura, era apatogenico para cobaia.

* * *

Acerca da etiologia da manqueira, muito se tem escrito e provavelmente ainda se escreverá. A opinião hoje mais aceita é a de ser a manqueira uma doença unitaria, provocada por uma unica especie

de agente patogenico, sendo essa especie o *Clostridium chauvoei*. Ha entretanto, outro modo de ver, que vem resistindo á destruição completa, e segundo o qual a manqueira é uma gangrena poliespecifica, ou pelo menos capaz de ser produzida por duas especies diferentes, como sejam o *Clostridium chauvoei* e o *Clostridium septicum*.

Cabe aqui estabelecer bem exatamente a distinção entre o quadro patologico conhecido no Brasil sob o nome de manqueira, correspondendo a «black leg» na lingua inglêsa, «Rauschbrand» na alemã, «charbon symptomatique» na francêsa, e as gangrenas gazosas dos animais, em geral. As gangrenas gazosas que constituem este segundo grupo exigem a presença de uma porta de entrada franca, com solução de continuidade dos tecidos superficiais e mortificação destes, suficiente para se instalar o fóco primario de infecção. Estas infecções seriam assim de ação primaria local. E' indubitavel, e não está em discussão, que as gangrenas deste tipo podem ocorrer nos ruminantes, podendo ser aí encontrados todos os anaerobios habituais nas gangrenas humanas; o proprio *Clostridium chauvoei,* frequente causa deste tipo de gangrena em carneiros, pode ser tambem seu agente no boi, conforme viu Ernst, citado por Mihailescu em 1934.

O nome manqueira seria reservado á infecção de tipo gangrenoso, de ação preferencial sobre o bovino novo, com porta de entrada ainda desconhecida, mas provavelmente pela mucosa da bôca ou das vias digestivas, sem disturbios imediatos no local de penetração, mas com formação de fócos á distancia, com zonas electivas de localização. A evolução em ambos os tipos de gangrena seria identica.

E' quanto á etiologia unica dessa gangrena de tipo especial, a manqueira, que ainda se discute. E a discussão tem sua base no fato do material que tem sido analisado para o estudo dessa doença, apresentar frequentemente outros anaerobios patogenicos causadores de gangrena, concomitantemente com o *Clostridium chauvoei,* ou mesmo na ausencia deste. Assim, compilando estatisticas apresentadas por Weinberg & Ginsborg, 1927, por Jungherr, 1928 e por Mihailesco, 1934, verifica-se que de mais de 1.200 exames de material dessa doença realizados por 24 diferentes autores entre 1919 e 1927, se obtem como resultado porcentual 63.4 *Cl. chauvoei* e 35.6 *Cl. septicum;* é de notar entretanto que em muitos casos, 13 a 17 % conforme Weinberg & Ginsbourg, estes dois germens são encontrados associados. Além dêles, observou-se ainda o *Cl. welchii* 28 vezes, sendo em 7 vezes o unico. E trabalho mais recente de Milcov, em 1933, fugindo completamente á média geral observada, anota em 42 casos apenas 4 vezes o *Cl. chauvoei,* nenhuma vez o *Cl. septicum*, 28 vezes o *Cl. welchii,* das quais 21 vezes sózinho, e 7 vezes o *Cl. novyi*, sendo 3 vezes o unico.

Estas são as bases materiais da hipótese de ser a manqueira uma doença polimicrobiana. O *Clostridium septicum,* principalmente, é considerado por numerosos autores como capaz de, por si só, promover uma doença tipica. Em menor grau, de acôrdo com sua frequencia, tambem o *Clostridium welchii* e o *Clostridium novyi* têm sido apontados como possiveis agentes etiologicos.

No entanto as idéas atuais tendem a dar ao *Cl. chauvoei* uma situação de mais absoluta predominancia. E as razões para tal são da seguinte ordem: os germens anaerobios da gangrena, encontrados associados ao *Cl. chauvoei*, ou mais raramente, como unico anaerobio patogenico presente, são habitantes normais da terra e do intestino, sendo sempre possivel a sua introdução como invasor cadaverico, ou na melhor hipótese, como fator secundario de infecção. Todos esses germens, com a unica excepção de *Cl. novyi,* proliferam abundantemente nos meios habituais de cultura, podendo afogar ou pelo menos mascarar o desenvolvimento do *Cl. chauvoei,* mais delicado. Além disso, a vacinação monovalente, contra este, susta o aparecimento da doença nas regiões infectadas.

Assim é que MIESSNER & SCHOOP em 1930 concluem que o papel da infecção mixta não deve ser exagerado, e que quando o material vem para exame, principalmente se em pedaços volumosos, pode-se quasi com certeza encontrar o *Cl. chauvoei* na parte central. Já em amostras velhas se encontra na maioria das vezes quasi exclusivamente o *Cl. septicum.* BOSWORTH, um dos relatores do assunto no 11.º Congresso Veterinario Internacional de 1930, conclue que a significação etiologica do *Cl. septicum* na manqueira do gado ainda não está provada. E SCOTT, TURNER & VAWTER, relatores perante o 12.º Congresso, em 1934, tambem admitem o *Cl. chauvoei* como o unico agente etiologico da manqueira, apoiados principalmente na eliminação pratica desta doença no Estado de Kansas, America do Norte, pelo uso de vacina monovalente, anti-*chauvoei,* conforme dados de SCOTT, 1932. Aduzem ainda esses autores, em favor dessa afirmativa, o resultado de 199 exames de laboratorio efetuados, assim distribuidos:

De 24 animais mortos de manqueira, embora previamente vacinados contra essa doença, o *Cl. chauvoei* é obtido 22 vezes, sendo isolado em cultura pura 8 vezes. O *Cl. septicum* é encontrado 8 vezes, unico em 2. O *Cl. welchii,* 7 vezes, e o *Cl. novyi,* 1 vez, sempre associados.

De 175 animais não vacinados previamente, o *Cl. chauvoei* foi encontrado 173 vezes, das quais 165 como unico agente patogenico. O *Cl. welchii* 8 vezes, sempre associado, o *Cl. novyi,* 2 vezes, sendo 1 vez o unico. O *Cl. septicum* não foi encontrado.

Recentemente D'ALESSANDRO, em 1937, conseguiu, em material colhido muito cedo de 20 casos, isolar 20 vezes o *Cl. chauvoei*, e nenhuma vez qualquer outro anaerobio de gangrena.

Considerando-se a extensão do Estado de S. Paulo, e as dificuldades aqui naturais para colheita e transporte, com inevitaveis perdas de tempo, compreende-se que as melhores condições do material submetido a exame estavam longe de ótimas. De material de 38 casos, do qual se pôde estabelecer o prazo decorrido entre morte e exame, o menor periodo foi de cerca de 24 horas, e o maior de 10 dias; não obstante, não pareceu haver estreita conexão entre o exame tardio e o resultado desse exame, dentro de certos limites; assim, foi ás vezes possivel encontrar e isolar o *Cl. chauvoei* ainda 7 dias após a morte, e em outros casos, seguramente positivos, ele não mais era encontrado 24 horas após. O que ha evidentemente é uma extrema dificultação da analise, pela presença e franca predominancia de numerosos contaminantes.

Dadas as dificuldades da nossa situação especial de trabalho, em região de grande área e temperatura sub-tropical, com transportes lentos e raros, os resultados de nossos exames em material de 44 remessas diferentes dão, como veremos adiante, uma indicação muito clara da grande predominancia, senão absoluta presença do *Clostridium chauvoei*, nos casos de gangrena gazosa dos bovideos novos, com os caracteristicos da manqueira, isto é, sem lesão externa aparente. Quanto ao *Clostridium septicum,* ha forte indicação de sua introdução secundaria, como seja o grande numero de vezes em que encontrado associado ao *Cl. chauvoei*, e a sua relativa raridade como unico agente patogenico encontrado.

* * *

E' admitido geralmente que a manqueira sofre influencia decisiva das estações climaticas, tendo seu apice de incidencia nos meses quentes e decaindo rapidamente no inverno. Assim VILJOEN & SCHEUBER verificam na Africa do Sul, em 1926, que ela aumenta na primavera e inicio do verão, principalmente depois de chuvas fortes. HOVE diz, em 1931, que na Alemanha ela ocorre de Maio a Outubro. Seria pois interessante verificar si no Brasil, especialmente em S. Paulo, as cousas se passam diferentemente, tanto mais que, segundo ROTTGARDT, 1932, quando se trata de manqueira ovina na Republica Argentina, esta ocorre de uma maneira homogenea durante todo o ano, decrescendo um pouco nos meses de maior calor.

Cotejando-se as datas de ocorrencia de nossos casos, e o resultado dos exames, tem-se um quadro que atráe a atenção para uma

possivel influencia da época do ano sobre o aparecimento da doença, como tambem da temperatura ambiente sobre o resultado do exame. Assim, pela analise comparativa dos recebimentos e resultados, em relação ao mês do ano, os nossos 44 casos distribuem-se da maneira exposta na Tabela 2.

E' evidente a primeira vista que o numero de casos estudados não permite qualquer conclusão definitiva. Ha entretanto aí uma indicação ligeira, mas que merece mais acurado estudo, de ser a incidencia de manqueira no Estado, variavel, acumulando-se os nossos recebimentos em Janeiro-Abril e em Agosto-Outubro, decaindo nos meses mais quentes e nos mais frios. Por outro lado, os resultados dos exames orientam para maior positividade durante os meses menos quentes.

TABELA 2

Relação do aparecimento de casos e de sua positividade com a época do ano

| Mês | N.º de casos | Positivos | Negativos |
|---|---|---|---|
| Janeiro . . . | 4 | 3 | 1 |
| Fevereiro . . | 2 | 1 | 1 |
| Março. . . . | 5 | 5 | 0 |
| Abril . . . . | 5 | 5 | 0 |
| Maio . . . . | 2 | 2 | 0 |
| Junho. . . . | 1 | 1 | 0 |
| Julho . . . . | 1 | 1 | 0 |
| Agosto . . . | 6 | 5 | 1 |
| Setembro. . . | 8 | 2 | 6 |
| Outubro . . . | 8 | 5 | 3 |
| Novembro .. . | 2 | 1 | 1 |
| Dezembro . . | 0 | — | — |

Nota: — Deve ser levado em consideração que em 3 dos casos de Setembro ocorreu um periodo de mais de 10 dias entre morte e exame.

A manqueira em carneiros não foi ainda observada no Estado, talvez porque a criação de ovinos é aqui incipiente, sendo eles mais empregados para fornecimento de carne. Talvez tambem porque, sendo esses animais de pequeno valor os proprietarios não se preocupam com as mortes. Sem sabermos ainda a razão, o fato é que ainda é desconhecida aqui a variedade ovina do *Clostridium chauvoei.*

## TEMPO UTIL DE EXAME

De grande importancia para o exito dos exames diagnosticos de manqueira é o periodo decorrido entre a morte do animal e o exame efectivo; o limite maximo deste periodo, compativel com um resultado favoravel, é o que chamamos tempo util de exame. Quanto maior é ele, mais dificil se torna a verificação do *Cl. chauvoei*, devido á invasão cadaverica e a maior prolifèração dos contaminantes inevitaveis, durante a colheita e remessa.

Já Newson, Cross & Dobbins, citados por Mihailescu em 1934, haviam verificado que, demorando-se a autopsia de animais mortos de manqueira, tem-se cada vez maior oportunidade de colher material contaminado pelo *Cl. septicum;* assim, depois de 1 hora, este já era verificado em 10 % dos casos; depois de 12 horas, em 56 %. Essa observação é interessante, embora não nos pareça que suas conclusões possam ser generalizadas, pois mesmo trabalhando com material em pessimas condições, não pudemos obter porcentagens tão elevadas.

Gerlach & Bauman, citados pelo mesmo autor, tomando o mesmo pedaço de musculo, dele isolaram o *Cl. chauvoei* quando ainda fresco, e o *Cl. septicum* após dessecamento. Ruppert & Rottgardt, 1926, isolaram o *Cl. septicum* de 100 %, em 30 animais abatidos em matadouro, 6 horas após a morte.

Essas observações reforçam o conselho de Raebiger & Spiegel, 1924, e de Karman, 1930, de dever o material de pesquisa ser colhido imediatamente após a morte. Si entretanto isso é verdade, no sentido de facilitar o diagnostico, pela menor frequencia de contaminantes, experiencias diversas vêm demonstrar que o *Cl. chauvoei* não é destruido pela concorrencia de outras especies. Schleich em 1925 pôde recuperar esporos misturados a carne putrefeita, depois de 40-50 dias. Tambem Zeller em 1925 pôde isolar o *Cl. chauvoei* de medula ossea de carcassas enterradas durante 3 meses. Ruppert & Rottgardt, citados por Mihailescu em 1934, retomando o estudo de musculos onde havia sido encontrado o *Cl. septicum*, puderam pôr em evidencia, em quasi todos, tambem o *Cl. chauvoei*. Becker, em 1922, verificou que mesmo a invasão secundaria, cadaverica, pelo menos em cobaia, não se dá antes de 50-60 horas da morte. Kraneveld & Djaenodin em 1938 trabalhando com musculo conservado em sal, puderam obter o isolamento do *Cl. chauvoei* depois de 132 horas, em zona tropical (Indias Holandêsas).

As indicações dadas por nossa experiencia, a este respeito, podem ser resumidas na tabela 3, onde se analizam os resultados do exame bateriologico em relação com a época do ano, o periodo decorrido entre a morte e o exame, e o material de partida.

TABELA 3

Relação entre o periodo decorrido entre morte e exame, e o resultado deste.

| Numero | Material | Tempo decorrido entre | | | Época | Resultado |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | morte e colheita | colheita e exame | morte e exame | | |
| 0030 | Musculo | 48 horas | <24 horas | > 48 horas | Janeiro | *c h a u v o e i*, *septicum*, *welchii*, contam. |
| 0038 | Osso/musc. | 24 horas | 48 horas | 72 horas | Fevereiro | *c h a u v o e i*, *septicum*, *welchii*, contam. |
| 0042 | Musculo | <24 horas | 24 horas | > 24 horas | Fevereiro | contaminantes patogenicos. |
| 0043 | Musculo | 24 horas | 72 horas | 96 horas | Março | *c h a u v o e i*, *welchii*, contaminantes. |
| 0093 | Osso | 120 horas | <24 horas | >120 horas | Agosto | contaminantes. |
| 0094 | Osso | 168 horas | <24 horas | >168 horas | Agosto | *c h a u v o e i*, contaminantes. |
| 0096 | Osso | 240 horas | <24 horas | >240 horas | Setembro | *tetani*, cont. patog. e apatog. |
| 0097 | Osso | 240 horas | <24 horas | >240 horas | Setembro | *septicum*, *tetani*, contaminantes. |
| 0098 | Osso | 240 horas | <24 horas | >240 horas | Setembro | *tetani*, contam. patog. e apatog. |
| 0103 A | Osso | ? | 24 horas | > 24 horas | Janeiro | contaminantes apatogenicos. |
| 0149 | Musculo | <24 horas | 48 horas | > 48 horas | Abril | *c h a u v o e i*, *septicum*, contaminantes. |
| 0175 | Osso | <24 horas | 72 horas | > 72 horas | Novembro | *c h a u v o e i*, *septicum*, contaminantes. |
| 0241 | Osso | ? | 72 horas | > 72 horas | Março | *welchii*, contaminantes. |
| 0250/1 | Osso/musc. | 1 hora | 53 horas | 54 horas | Março | *c h a u v o e i*, *septicum*, cont. pat. e apat. |
| 0252/3 | Osso/musc. | ? | 72 horas | > 72 horas | Março | *c h a u v o e i*, contaminantes. |
| 0254/5 | Osso/mucc. | 96 horas | 24 horas | 120 horas | Março | *c h a u v o e i*, *septicum*, contaminantes. |
| 0256/7 | Osso/musc. | 24 horas | 24 horas | 48 horas | Abril | *c h a u v o e i*, *septicum*, contaminantes. |
| 0258 | Osso | 24 horas | 24 horas | 48 horas | Abril | *c h a u v o e i*, *septicum*, contaminantes. |
| 0259/60 | Osso/musc. | <24 horas | 48 horas | > 48 horas | Abril | *c h a u v o e i*, *septicum*, contaminantes. |
| 0263/4 | Osso/musc. | 15 horas | 48 horas | 63 horas | Abril | *c h a u v o e i*, contaminantes. |
| 0266 | Osso | 72 horas | 24 horas | 96 horas | Agosto | *c h a u v o e i*. |
| 0268 | Osso | ? | 96 horas | > 96 horas | Agosto | *c h a u v o e i*, contaminantes. |
| 0269 | Figado | 25 horas | 96 horas | 120 horas | Agosto | *c h a u v o e i*, contaminantes. |
| 0271 | Osso | 6 horas | 96 horas | 102 horas | Setembro | *welchii*, contaminantes. |
| 0273 | Osso | 12 horas | 96 horas | 108 horas | Setembro | *c h a u v o e i*. |
| 0274/5 | Osso/musc. | 72 horas | 96 horas | 168 horas | Outubro | *c h a u v o e i*, contam. patog. e apatog. |
| 0276/7 | Osso/musc. | 12 horas | 24 horas | 36 horas | Outubro | *c h a u v o e i*. |
| 0279/80 | Osso/musc. | 12 horas | 72 horas | 84 horas | Outubro | *c h a u v o e i*, contaminantes. |

Nota: — Em qualquer caso, o numero de horas decorrido é dado em carater aproximativo. O termo «contaminantes», encontrado na ultima coluna, refere-se a germens apatogenicos, aerobios ou anaerobios.

Infere-se dessa tabela que, mesmo 168 horas após a morte, nos foi possivel isolar o *Clostridium chauvoei* de carcassas, infectadas em condições naturais. 240 horas após, não mais foi possivel encontra-lo, ou melhor, isola-lo. Com uma unica exceção, relativa a um caso em que foi obtida cultura pura a partir de osso, depois de 96 horas, em todos os outros, contaminantes diversos apatogenicos foram encontrados constantemente, acompanhando o *Cl. chauvoei*, independentemente do material de partida para o exame.

Contaminantes patogenicos, do grupo da gangrena, presentes em boa porcentagem de casos, não nos parecem ter sua ocorrencia ligada a condições de colheita, mas antes á sua presença anterior no organismo infectado. E' digno de nota que, mesmo em material colhido uma hora após a morte, já se notava a presença de *Cl. septicum* e outros contaminantes, patogenicos ou não. Tambem merece nota a predominancia de contaminantes patogenicos nos mêses de verão, como tambem a importancia, ressaltada, do exame logo após a colheita, tão importante a nosso ver como a colheita logo após morte.

E' aqui de interesse anotar que, por tres vezes recebemos material móle, musculo e figado, conservado em meio glicerinado; para o primeiro desses, de numero 0260, conservado em glicerina pura, não foi possivel estabelecer exatamente o tempo decorrido entre morte e exame. O segundo, 0269 e o terceiro, 0275, conservados no meio de Bedson, esperaram respectivamente 120 e 168 horas. Nestes tres casos, pôde ser isolado o *Cl. chauvoei,* sem dificuldade.

## TECNICA DE EXAME

Em relação á tecnica propriamente dita, tomou a nossa atenção a analise das seguintes questões: valor comparado do material de partida, valor do aquecimento previo, e sequencia mais apropriada a ser dada ao exame.

A) Influencia da escolha do material de partida: — Em relação ao material geralmente empregado para o exame diagnostico de manqueira, as preferencias oscilam entre musculo fresco, como é, aconselhado pelo governo alemão, Regulamento de 1923; musculo dessecado, como usam Karman, Zeissler e outros; osso, conforme Balozet, 1926, Pfeiler & Goerttler, 1922; musculo em sal, preferido por Kaneveld & Djaenodin, 1938. A conjugação dos exames de musculo e osso é aconselhada por Raebiger & Spiegel em 1924, Rottgardt em 1932, D'Alessandro em 1937. O uso de musculo, conservado em meio glicerinado, é citado por Rottgardt em 1932. Este mesmo autor verifica que a medula ossea contem mais frequentemente o germen na doença experimental que na espontanea.

Procuramos fazer a analise comparativa do valor de musculo e osso, e tivemos para isso em mãos os seguintes materiais: 0038; 0250/1; 0252/3; 0254/5; 0256/7; 0257/8; 0259/60; 0263/4; 0274/5; 0276/7; e 0279/80. Estes se referem sempre a bovinos com diagnostico clinico de manqueira, dos quais eram colhidos simultaneamente, e a nós enviados separadamente, um pequeno osso longo, e pedaço de musculo da região afetada. O exame era feito seguindo sempre as mesmas linhas gerais, expostas na tabela 4.

TABELA 4

| Emulsão | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aquecida | | | | Não aquecida | | | |
| Placa | Cobaia | Tarozzi | | Cobaia | Tarozzi | | Placa |
| Tarozzi | Tarozzi | Placa | Cobaia | Tarozzi | Cobaia | Placa | Tarozzi |
| Cobaia | Placa | Tarozzi | Tarozzi | Placa | Tarozzi | Tarozzi | Cobaia |
| Tarozzi | Tarozzi | Cobaia | Placa | Tarozzi | Placa | Cobaia | Tarozzi |
| Placa | Cobaia | Tarozzi | Tarozzi | Cobaia | Tarozzi | Tarozzi | Placa |
| Tarozzi | Tarozzi | Placa | Cobaia | Tarozzi | Cobaia | Placa | Tarozzi |
| Serie | Placa | Tarozzi | Tarozzi | Placa | Tarozzi | Serie | Serie |
| | Tarozzi | Serie | Placa | Tarozzi | Placa | | |
| | Serie | | Tarozzi | Serie | Tarozzi | | |
| | | | Serie | | Serie | | |

Os resultados dos exames efetuados segundo este esquema são expostos na tabela 5, em que são confrontados, em relação a cada caso, os resultados de osso e de musculo.

TABELA 5

Correspondencia entre os resultados de exame a partir de osso e musculo

| Material | Epoca | Tempo decorrido | Exame de musculo | Exame de osso |
|---|---|---|---|---|
| 0038 | Verão | 48 hs. | W — C | Ch — VS — W — C |
| 0250/1 | Verão | 54 hs. | Ch — VS — C | VS — CP — C |
| 0252/3 | Verão | > 72 hs. | Ch — C | Ch — C |
| 0254/5 | Verão | 120 hs. | Ch — VS — C | Ch — VS — C |
| 0256/7 | Inverno | 48 hs. | Ch — C | Ch — C |
| 0257/8 | Inverno | 48 hs. | Ch — C | Ch — C |
| 0259,0 | Inverno | > 48 hs. | Ch — VS — C | Ch — C |
| 0263/4 | Inverno | 63 hs. | Ch — C | Ch — C |
| 0274/5 | Verão | 168 hs. | Ch — CP — C | Ch — C |
| 0276/7 | Verão | 36 hs. | Ch — C | Ch |
| 0279/0 | Verão | 84 hs. | Ch — C | Ch — C |

Legenda: — Ch = *Cl. chauvoei.* VS = *Cl. septicum.* W = *Cl. welchii.*
CP = Anaerobios patogenicos não identificados.
C = Anaerobios apatogenicos.

Analisada sumariamente, esta tabela não indica especial vantagem entre um material e outro, pois com uma exceção para o caso de musculo, e outra para o de osso, de todos eles foi isolado o *Clostridium chauvoei.* E' necessario considerar que se trata aqui de exames extremamente minuciosos, levados a efeito com o intuito de reconhecer todas as especies bacterianas patogenicas presentes no material em analise, sem levar em conta as dificuldades desta. Quando analisarmos a influencia do aquecimento previo da tecnica de exames, voltaremos a esta questão. Aqui vamos apenas apresentar o tempo decorrido entre o começo da analise e o reconhecimento do *Cl. chauvoei* nos casos acima enumerados. Vê-se que ha uma pequena diferença em favor de osso, em relação ao tempo necessario para reconhecer o *Cl. chauvoei,* o que refléte naturalmente as dificuldades de exame, assim, a partir de musculo, o praso necessario para o estabelecimento do diagnostico variou entre 3 e 22 dias, ao passo que a partir de osso ficou entre 3 e 13.

TABELA 6

Tempo exigido para o diagnostico, a partir de osso ou musculo

| Material | Diagnostico a partir de | |
|---|---|---|
| | Musculo | Osso |
| 0038 | — | 5 dias |
| 0250/1 | 6 dias | — |
| 0252/3 | 22 dias | 10 dias |
| 0254/5 | 19 dias | 13 dias |
| 0256/7 | 9 dias | 10 dias |
| 0257/8 | 9 dias | 6 dias |
| 0259/0 | 5 dias * | 6 dias |
| 0263/4 | 5 dias | 5 dias |
| 0274/5 | 5 dias * | 5 dias |
| 0276/7 | 3 dias | 3 dias |
| 0279/0 | 3 dias | 3 dias |

* Material conservado em glicerina.

O reconhecimento, para os fins desta tabela 6, era baseada no aspéto morfologico, crescimento em placa e em meio de Tarozzi, quadro da doença na cobaia e exame bacterioscopico da impressão do peritonio desta.

De qualquer forma, pode-se concluir do resultado das analises comparativas efetuadas, que de um modo geral é **indiferente usar musculo ou osso,** como material de partida para o diagnostico de manqueira; parece haver em certos casos uma ligeira vantagem da medula ossea, quando se trata de material examinado muito tempo depois da morte; é tambem digna de consideração a maior facilidade que oferece a remessa de ossos, sobretudo de longa distancia.

B) — Influencia do aquecimento das emulsões de partida: — O aquecimento do material a examinar tem, como metodo absoluto, as limitações já expostas no inicio deste trabalho. Entretanto, seria interessante determinar seu valor relativo, isto é, comparado com o de materiais em identicas condições e não aquecidos.

Kraneveld & Djaenodin, 1938, submetem sistematicamente seu material de pesquisa á temperatura de 70° C durante 10′. Prova indiréta da possivel utilidade deste metodo foi colhida por Schleich, 1925, que empregou com vantagem o aquecimento a essa temperatura para o isolamento do *Cl. chauvoei*, de material experimental muito contaminado. Entretanto, Raebiger & Spiegel, em 1924, julgam dispensavel o aquecimento, desde que se pretenda começar a analise por inoculação em cobaia.

Nossas verificações sobre aquecimento previo da emulsão do material de pesquisa dizem respeito a 33 exames, na maioria dos quais se comparou a analise do material em natureza com a do material aquecido á temperatura de 80° C durante 10′. 21 vezes se fez essa comparação, e seus resultados nos foram de certa maneira surpreendentes, pois de 20 materiais contendo seguramente o *Clostridium chauvoei,* apenas 8 vezes este pôde ser isolado do material aquecido a 80° C. 9 vezes o aquecimento a essa temperatura esterilizou completamente a emulsão, e 3 vezes matou o *Cl. chauvoei* e não outros germens.

O aquecimento a 80° C, durante 30′, a principio usado de preferencia, foi feito 9 vezes, com 4 resultados positivos e 5 negativos; destes, 3 continham seguramente o *Cl. chauvoei.* Cabe aqui anotar que esse aquecimento se fazia inicialmente em tubo aberto, metodo sabidamente imperfeito.

O aquecimento a 60° C, durante 10′ ou 15′, foi verificado 8 vezes, com 6 resultados positivos e 2 negativos, estes com esterilização completa.

Verifica-se assim da tabela 7, em que estes resultados estão enfeixados, que o aquecimento de emulsões de organs é sempre perigoso para a vitalidade do *Clostridium chauvoei,* acaso aí existente. Mesmo a permanencia a 60° C durante 10′ é ás vezes suficiente para destrui-lo. Entretanto este metodo, usado colateralmente como recurso de emergencia, pode prestar serviços, como se vê de 7 casos em que o material não aquecido, excessivamente contaminado, não permitiu o isolamento, o qual no entanto pôde ser feito a partir de material previamente aquecido.

C) Desenvolvimento do exame: — A sequencia propriamente do exame tem com certeza o maior interesse. Rottgardt em 1932 usa

inocular o material dirétamente em cobaia, quando constituido de musculo; partindo de osso, faz em meio liquido cultura previa de enriquecimento, passando em seguida em placa. KRANEVELD & DJAENODIN, 1938, partem sempre de musculo fresco, conservado em sal; aquecem esse material a 70° C durante 10′, e o dividem em duas partes, uma das quais é semeada em placa, e a outra inoculada em cobaia. Acham que o enriquecimento primario em Tarozzi tem apenas valor acessorio.

TABELA 7

Influencia do aquecimento previo sobre o resultado do exame diagnostico

| Exame | Material | Natural | Temperatura e tempo de ação | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 60°, 10-15′ | 60-65°, 30′ | 80°, 10′ | 80°, 30′ |
| 0030 | Musculo | *chauvoei* | — | — | — | *chauvoei* |
| 0031 | Musculo | *chauvoei* | — | — | — | cc |
| 0038 | Musculo | ccc | — | ccc | — | cc |
| 0038 | Osso | ccc | — | ccc | — | *chauvoei* |
| 0043 | Musculo | *chauvoei* | — | — | — | cc |
| 0094 | Osso | cc | — | — | — | *chauvoei* |
| 0147 | Osso | *chauvoei* | — | — | — | cc |
| 0149 | Musculo | ccc | — | — | — | ccc |
| 0149 | Osso | *chauvoei* | — | — | — | — |
| 0175 | Osso | ccc | — | *chauvoei* | — | — |
| 0200 | Osso | — | — | — | — | *chauvoei* |
| 0251 | Musculo | cc | — | — | *chauvoei* | — |
| 0252 | Osso | *chauvoei* | — | — | n/vegeta | — |
| 0253 | Musculo | *chauvoei* | — | — | n/vegeta | — |
| 0254 | Osso | *chauvoei* | — | — | n/vegeta | — |
| 0255 | Musculo | ccc | — | — | *chauvoei* | — |
| 0256 | Osso | ccc | *chauvoei* | — | n/vegeta | — |
| 0227 | Musculo | ccc | — | — | *chauvoei* | — |
| 0258 | Osso | *chauvoei* | n/vegeta | — | n/vegeta | — |
| 0259 | Osso | *chauvoei* | — | — | *chauvoei* | — |
| 0260 | Musculo | *chauvoei* | — | — | n/vegeta | — |
| 0263 | Osso | *chauvoei* | *chauvoei* | — | n/vegeta | — |
| 0264 | Musculo | *chauvoei* | — | — | *chauvoei* | — |
| 0266 | Osso | *chauvoei* | *chauvoei* | — | — | — |
| 0268 | Osso | *chauvoei* | — | — | cc | — |
| 0269 | Figado | *chauvoei* | — | — | *chauvoei* | — |
| 0274 | Osso | cc | — | — | — | — |
| 0275 | Musculo | *chauvoei* | — | — | — | — |
| 0276 | Osso | *chauvoei* | n/vegeta | — | n/vegeta | — |
| 0277 | Musculo | *chauvoei* | *chauvoei* | — | n/vegeta | — |
| 0279 | Osso | *chauvoei* | *chauvoei* | — | *chauvoei* | — |
| 0280 | Musculo | *chauvoei* | *chauvoei* | — | cc | — |

Nota: — «c» representa germens da contaminação, cuja abundancia está indicada pelo numero de repetições.
«—» indica que o exame não foi feito.

D'ALESSANDRO, 1937, tambem partindo de musculo e ossos longos, mói o primeiro, dilue-o a $^1/_5$, sendo esta diluição semeada em placa e meio de Tarozzi, como tambem inoculada em cobaia. Não emprega aquecimento. A medula ossea, sem diluição, sofre o mesmo processo.

Por nós foram experimentadas, em relação á tecnica a ser seguida nos exames, as seguintes combinações:

1) Passagem diréta do material a estudar, em placas em anaerobiose, tanto em natureza como depois de aquecido.

2) Enriquecimento parcial em Tarozzi, com provavel diminuição relativa do numero de aerobios, e passagem consecutiva em placa.

3) Enriquecimento integral, primeiro em Tarozzi, depois em cobaia, com provavel afastamento de aerobios, e anaerobios apatogenicos.

4) Enriquecimento parcial em cobaia, com provavel afastamento dos germens apatogenicos.

Para esta comparação foram tomados 20 casos, de musculo ou osso, aquecido previamente ou não. Dado que, como já foi demonstrado anteriormente, a influencia do material de partida é pouco notavel, nas condições de colheita verificadas, não foi levada em consideração na tabela 8 a natureza deste material.

Verifica-se do exame desta tabela, que o aquecimento previo seria indubitavelmente um grande fator de sucesso, não fossem as variações de resistencia do *Cl. chauvoei* quanto a ele; sendo extremamente tedioso o uso da exposição de diversas porções da emulsão original a diversas temperaturas, e o estudo particular de cada uma dessas porções, não se pode negar que seja este um grave inconveniente do metodo, que de 21 materiais esterilizou 9, a 80° C durante 10', e de 8 esterilizou 2, a 60° C, pelo mesmo tempo. Fica evidenciado pelo exame do caso 0038, que mesmo o aquecimento a 65° C durante 30' é insuficiente, no caso de material fortemente contaminado; e pelo exame dos casos 0268 e 0275, que os germens de contaminação podem resistir melhor ao aquecimento que o *Cl. chauvoei;* de forma que a conclusão geral que se poderia tirar do uso de aquecimento previo, é que sua intensidade deve variar conforme as condições originais do material. Assim, si este é pouco contaminado, a exposição a 60° C durante 10' pode, dentro de certa medida, favorecer o isolamento; no caso de material muito contaminado, é necessario correr o risco de esterilizar o *Cl. chauvoei,* aquecendo o material a temperaturas mais elevadas.

Em qualquer hipótese, a inoculação diréta em cobaia, bem como a passagem diréta em placa, do material aquecido, parecem desaconselhaveis, dada a pequena porcentagem de

TABELA 8

Resultados obtidos conforme a sequencia diagnostica

| Numero | Positividade para *Cl. chauvoei* | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | MATERIAL NÃO AQUECIDO | | | | MATERIAL AQUECIDO | | | |
| | Placa | Tarozzi Placa | Tarozzi Cobaia | Cobaia | Placa | Tarozzi Placa | Tarozzi Cobaia | Cobaia |
| 0030 | *chauvoei* | cc | cc | *chauvoei* | — | *chauvoei* | — | — |
| 0031 | *chauvoei* | cc | cc | *chauvoei* | — | cc | — | — |
| 0038 | cc | cc | cc | cc | — | *chauvoei* | — | — |
| 0147 | cc | cc | *chauvoei* | cc | cc | cc | — | cc |
| 0149 | — | cc | — | cc | cc | cc | — | cc (2) |
| 0162 | — | *chauvoei* | — | cc | — | cc | cc | — |
| 0175 | cc | cc | — | cc | *chauvoei* | cc | cc | cc |
| 0200 | — | cc | — | cc | — | cc | — | *chauvoei* |
| 0250 | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc | cc (1) |
| 0251 | — | cc | cc | cc | cc | *chauvoei* | *chauvoei* | cc |
| 0252 | cc | cc | *chauvoei* | cc | N/vegeta | N/vegeta | N/vegeta | N/reage |
| 0253 | cc | cc | *chauvoei* | cc | N/vegeta | N/vegeta | N/vegeta | N/reage |
| 0254 | *chauvoei* | *chauvoei* | cc | cc | N/vegeta | N/vegeta | N/vegeta | N/reage |
| 0255 | — | cc | *chauvoei* | cc | cc | cc | *chauvoei* | cc |
| 0256 | cc | cc | cc | cc | — | *chauvoei* | *chauvoei* | — |
| 0257 | — | cc | cc | cc | *chauvoei* | cc | cc | cc |
| 0258 | cc | cc | *chauvoei* | cc | N/vegeta | N/vegeta | N/vegeta | N/reage |
| 0259 | cc | cc | *chauvoei* | cc | cc | *chauvoei* | *chauvoei* | cc |
| 0260 | *chauvoei* | cc | cc | cc | N/vegeta | N/vegeta | N/vegeta | N/reage |
| 0263 | *chauvoei* | *chauvoei* | *chauvoei* | cc | — | *chauvoei* | *chauvoei* | — |
| 0264 | — | cc | *chauvoei* | *chauvoei* | cc | *chauvoei* | cc | *chauvoei* |
| 0266 | — | *chauvoei* | — | cc | — | *chauvoei* | *chauvoei* | — |
| 0268 | *chauvoei* | cc | — | cc | cc | cc | — | — |
| 0269 | *chauvoei* | — | *chauvoei* | cc | cc | *chauvoei* | cc | — |
| 0274 | cc | cc | cc | cc | cc | cc | *chauvoei* | N/reage |
| 0275 | cc | cc | cc | *chauvoei* | cc | cc | cc | N/reage |
| 0276 | N/vegeta | *chauvoei* | *chauvoei* | N/reage | N/vegeta | N/vegeta | N/vegeta | — |
| 0277 | *chauvoei* | — | — | N/reage | *chauvoei* | *chauvoei* | *chauvoei* | N/reage |
| 0279 | *chauvoei* | — | *chauvoei* | N/reage | *chauvoei* | cc | *chauvoei* | N/reage |
| 0280 | *chauvoei* | — | *chauvoei* | N/reage | *chauvoei* | cc | N/reage | N/reage |
| Posit.: | 10 | 5 | 12 | 4 | 5 | 10 | 9 | 2 |
| Negat.: | 12 | 21 | 11 | 26 | 17 | 20 | 14 | 18 |

Notações : — (2), (1) = positivos em outra amostra do mesmo caso. cc = contaminantes diversos. — = não foi efetuado.

isolamento que daí resulta. O enriquecimento previo em Tarozzi dá sistematicamente resultados mais favoraveis. A passagem, entretanto, desta cultura enriquecida em placas só se mostra vantajosa quando se partiu de material aquecido, sendo as placas semeadas com material não aquecido tomadas na maioria das vezes por veu de crescimento indiferenciado, que impede totalmente o reconhecimento do *Clostridium chauvoei,* e manobras ulteriores para isolá-lo.

O metodo mais favoravel, em qualquer caso, parece ser a passagem, em cobaia, do material não aquecido, enriquecido previamente por semeadura em Tarozzi.

Assim pois, como resultado das verificações efectuadas, em relação á sequencia mais favoravel, pode-se concluir que a técnica que melhores resultados ofereceu foi a de enriquecimento previo em Tarozzi, com ulterior inoculação em cobaia, hemocultura desta e passagem em placa. Como meios acessorios, a passagem diréta do material a examinar em placa de cultura, e a passagem em placa e cobaia, do material enriquecido em Tarozzi, após aquecimento a 60° C ou 80° C, conforme a circunstancia.

O aquecimento de culturas enriquecidas em meio de Tarozzi não foi por nós experimentado, porque exigiria uma perda de tempo elevada, com o necessario praso para a esporulação do *Cl. chauvoei,* acarretando ainda forçosamente a esporulação de outros germens indesejaveis.

Pouco podemos dizer a respeito do valor do cloral e fenol, empregados nas culturas em placa, como anti-invasores. Nós os utilizamos raramente, como ultimo recurso, quando se tratava de culturas onde havia indicação da presença do *Cl. chauvoei,* mas nas quais estavam tambem presentes germens invasores, que não nos foi possivel afastar nem por aquecimento, nem por passagens em cobaia, nem por sucessivos reisolamentos em placa. Nesta situação, unica aliás em que o metodo nos seria valioso, não foi possivel obter resultados apreciaveis, em primeiro logar porque a resistencia do *Cl. chauvoei* e tambem dos contaminantes á ação bactericida e narcotica destas substancias nos pareceu extremamente variavel, e em segundo logar porque colonias obtidas por este metodo, com aparencia normal e pura na ocasião do isolamento, muitas vezes apresentavam ulteriormente a mesma contaminação inicial. Dado entretanto o pequeno numero de verificações efetuadas, e o grau extremo de contaminação nos casos em que o processo foi tentado, não nos sentimos autorizados a formar juizo definitivo a respeito. A junção de fenol a meios liquidos, de enriquecimento, não foi experimentada.

Nota: — Os meios de cultura usados no curso das pesquisas aqui relatadas foram:

A) Placas de agar-sangue conforme Fortner, com sangue de carneiro na proporção de 10 %, sêcas por permanencia de 24 horas a 37° C.

B) Meio de Tarozzi, constituido de caldo de carne peptonado, em tubos contendo tambem um pedaço de figado de boi, tudo recoberto com vaselina solida.

Para a manutenção das culturas sobre placa em anaerobiose, foi utilizada a jarra de anaerobiose por nós descrita (Rodrigues 1936).

Quero aqui pôr em relevo os meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. Rocha Lima e ao Dr. Victor Carneiro, que gentilmente me auxiliaram na redação do presente escrito, e salientar o auxilio técnico eficaz que me prestaram Luiz G. de Vasconcellos e Orlando Martins.

## RESUMO

Estudando 44 casos de gangrena gazosa de bovideos, com o diagnostico clinico de manqueira, foi possivel isolar de musculo, ou osso, ou ambos, 31 vezes o *Clostridium chauvoei*. Este se apresentava isolado em 21 dos casos; em 10 casos estavam associado ao *Clostridium septicum,* ou ao *Clostridium welchii,* ou a ambos. 5 vezes não foi encontrado o *Clostridium chauvoei,* mas sim outros anaerobios esporulados patogenicos, do grupo da gangrena, na verdade os mesmos acima citados. Em nenhum caso foram encontrados, sós ou associados, o *Clostridium novyi* ou o *Clostridium histolyticum*. Em 8 vezes não foi possivel chegar a diagnostico, na metade destes casos por não existir nenhum germen patogenico no material recebido, e nos outros porque, dada a extrema contaminação do material a examinar, germens da gangrena aí existentes não puderam ser isolados nem reconhecidos.

Analisando as condições de colheita do material dos diversos casos examinados, assim como os resultados dos exames e as dificuldades naturais do isolamento do *Clostridium chauvoei,* parece-nos razoavel admitir como provavel uma etiologia unica para a manqueira no Estado de S. Paulo, com a responsabilidade do *Clostridium chauvoei.*

Os exames efectuados no inverno apresentaram maior indice de positividade que os efectuados no verão. Este fáto parece relacionado com a provavel melhor conservação do material examinado.

Estudando a possibilidade de reconhecimento do *Clostridium chauvoei* em musculo e osso, examinados depois de periodos deter-

minados após a morte, em casos de infecção natural, póde ser verificado que isso é possivel 7 dias depois da morte; após 10 dias não foi possivel reconhecer este germen, em material com diagnostico clinico de manqueira.

O aquecimento previo do material de pesquisa apresenta inconvenientes que limitam seu emprego. Estes dizem respeito principalmente a variações de resistencia do *Clostridium chauvoei*, ligadas provavelmente á esporulação ausente ou pouco intensa, em certas condições. Assim, póde ser verificado que o aquecimento do material a 80° C durante 10' acarretou a destruição do *Clostridium chauvoei* em 9 casos sobre 21, e que mesmo a temperatura de 60° C, mantida pelo mesmo tempo, foi capaz de esteriliza-lo em 2 casos sobre 8. Parece entretanto que, tomadas as devidas precauções, o metodo pode ser utilizado com vantagem, no caso de peças colhidas ou examinadas muito tempo após a morte, quando o reconhecimento e isolamento do *Clostridium chauvoei* pode ficar assim facilitado.

Partindo de peças em condições naturais, foi efectuado um estudo comparativo das diversas tecnicas possiveis da rotina de isolamento. As tecnicas experimentadas foram:

1) Passagem diréta do material original em placas de anaerobiose conforme FORTNER.

2) Enriquecimento previo em caldo de Tarozzi, e passagem consecutiva na placa de anaerobiose.

3) Enriquecimento previo em caldo de Tarozzi, inoculação da cultura em cobaia.

4) Inoculação diréta do material original em cobaia.

Para este estudo comparativo foram tomados 20 casos, de 11 dos quais foram estudados separadamente osso e musculo. O material era sempre dividido em 2 partes, das quais uma era aquecida. A temperatura empregada para o aquecimento foi na maioria dos casos a de 80° C; muitas vezes o material se mostrava esteril após esse aquecimento, e em alguns destes casos, uma parte do material, que fôra conservada á noite na geladeira, era então aquecida a 60° C.

De todas as tecnicas experimentadas, a que se mostrou mais favoravel foi o enriquecimento previo da emulsão original não aquecida, em caldo de Tarozzi, e inoculação da cultura de 24 horas em cobaia, com subsequente hemocultura desta e passagem em placa de anaerobiose, conforme FORTNER.

Como técnicas acessorias mostraram-se uteis a passagem diréta da emulsão não aquecida em placa de anaerobiose, e em certos casos, de acôrdo com as circunstancias, o aquecimento a 80° C ou 60° C,

subsequente cultura de enriquecimento em caldo de Tarozzi, e passagem desta em placa de anaerobiose, ou em animal de laboratorio.

As seguintes tecnicas mostraram-se pouco aconselhaveis: a) semeadura diréta da emulsão original aquecida, em placa de anaerobiose; b) enriquecimento em caldo de Tarozzi, da emulsão não aquecida, e passagem subsequente em placa de anaerobiose; c) inoculação diréta em cobaia, tanto do material aquecido como do não aquecido.

Foi verificado que de um modo geral é indiferente usar musculo ou osso, como material de partida para o diagnostico. Só parece haver uma ligeira vantagem tecnica do exame a partir de medula ossea, quando o material é examinado muito tempo depois da morte. E' tambem digna de consideração a maior conveniencia que oferece a remessa de ossos, quando se trata de longas distancias.

## STUDIES ON BLACK-LEG ("MANQUEIRA").

### ETIOLOGY. DIAGNOSIS.

### *Abstract*

*Trying to identify the etiological agents of black-leg (symptomatic anthrax) in São Paulo, Brazil, there were studied 44 cases of this disease.*

*Clostridium chauvoei was found as the only pathogenic anaerobe in 21 cases; Cl. chauvoei was verified in 10 instances more, but then associated with other pathogenic anaerobes, namely with Clostridium septicum or with Clostridium welchii, or with both.*

*Cl. chauvoei could not be obtained from 5 of the cases, but other spore-bearing pathogenic anaerobes were found, belonging to the same species as those mentioned above. In no case there were found, alone or associated, Clostridium novyi or Clostridium histolyticum.*

*In 8 cases it was not possible to come to a decision from the examinations, in half of these cases because of the fact that there was no pathogenic organisms in the received material; in the other cases, the anaaerobes of gas-gangrene, that were present, could not be isolated because of high contamination of the examined materials.*

*On analysing the results obtained, as well as the precarious condition of many of the specimens submitted for examination, and the natural difficulties encountered in the isolation of Cl. chauvoei, it seems reasonable to admit that black-leg is caused in São Paulo by Cl. chauvoei, this organism being, therefore, probably the only responsible for the disease here.*

*The examinations carried out in winter afforded better results than those made in summer. This fact could be obviously expected, and is probably due to the better condition of the material received for examination.*

*Studying the possibility of determining the presence of Cl. chauvoei in bone-marrow and muscle, examined at variable periods after death, in cases of natural infection, we could observe that the determination was possible even 168 hours after death; after 240 hours Cl. chauvoei could not be recognized.*

*Previous heating of the material to be examined proved to be mostly inconvenient, under our working conditions. This is caused by the variable heat-resistence shown by Cl. chauvoei in fresh tissue. Exposition to 80° C for 10 minutes was sufficient to kill Cl. chauvoei in 9 samples from a group of 21; exposition to 60° C for 10 minutes was yet sufficient to esterilize two samples from 8. Nevertheless, it appears that, in the case where much time has elapsed between death and analysis, a previous heating of the material to be examined proved to be useful in some cases.*

*Special consideration was given to the comparative study of different techniques for routine diagnosis. We compared the following methods:*

- *A) Immediate cultivation of the original emulsion on anaerobic blood-agar plates.*
- *B) Previous enrichment culture in Tarozzi-broth, for 24 hours, and subsequent plating.*
- *C) Previous enrichment culture in Tarozzi-broth, for 24 hours, and subsequent inoculation in laboratory-animals (guinea-pigs).*
- *D) Immediate inoculation in guinea-pigs.*

*For these tests we selected 20 cases, from 11 of which pieces of muscle and bones were separatedly obtained and studied. The bone-marrow and muscle were emulsioned in saline, and half the amount was exposed to a temperature of 60° C or 80° C for 10 minutes. So, in each separate case 4 tests were made, using bone-marrow or muscle emulsion, heated or unheated.*

*The tests indicate that the best method for the treatment of materials sent for diagnosis, in the condition in which they are generally received here, is the previous enrichment during 24 hours in Tarozzi-broth, of the original unheated emulsion, and inoculation of this culture in guinea-pigs, the blood-culture of which is subsequently plated.*

*Added utility was shown by the following methods:*

*1) Immediate plating of the original unheated emulsion.*

*2) Previous heating, Tarozzi culture, subsequent plating or animal inoculation.*

*The following methods were verified to be valueless:*

*1) Immediate plating of the heated emulsion.*

*2) Immediate animal inoculation of heated or unheated emulsions.*

*3) Tarozzi culture of the unheated emulsion, subsequent plating.*

*It was moreover verified that there is no basic difference in the use of bone-marrow or muscle, as diagnostic material. The bone-marrow offers some advantage only when a long time has passed between death and examination; and this material is easier to handle and to remit.*

## BIBLIOGRAFIA

APFELBECK, M. — 1922 — Untersuchungen ueber die Dampfresistenz der Rauschbrandsporen. *Arch. f. Hygiene,* **91**, 244 (Ref. in Bull. Inst. Pasteur, 1925.)

BALOZET, L. — 1926 — Isolement de Clostridium chauvoei par culture de moelle osseuse. *Compt. Rendu d. Soc. Biol.,* **95**, 295 (Ref. in Bull. Inst. Pasteur, **24**, 778.)

BECKER, L. — 1922 — Die Anaerobenflora des Meerschweinkadavers und ihre Bedeutung für die Rauschbranddiagnose durch den Tierversuch am Meerschwein. *Ztschr. Infekth. Haust.,* **22**, 14-19.

BOSWORTH, T. J. — 1930 — *Rept. 11th Intern. Veter. Cong.,* London 1930, **3**, 199.

D'ALESSANDRO, N. V. — 1937 — Las diversas formas anatomopatologicas de la «Mancha» de los terneros, en relacion a los germenes causales. *Rev. de la Faculd. de Agr. y Veter.,* B. Ayres, **7**, 373-99.

FORTNER, J. — 1929 — Zur Technik der Anaerobenzüchtung. *Centr. Bakter.,* I, O, **110**, 233-54.

GOIDSENHOVEN, C. VAN & BERTRAND, G. — 1935 — Sur la differentiation du Bacille de Chauveau et du Vibrion septique de Pasteur. *Ann. Inst. Pasteur,* **55**, 74-102.

GOMES DE FARIA, J. — 1908 — Contribuição ao estudo de Carbunculo symptomatico. These medica, Rio de Janeiro.

HOVE, K. R. — 1931 — Die Deutschen Rauschbrandgebiete. *Deut. Tierärztl. Wochens.,* pg. 404.

JUNGHERR, E. — 1928 — A comparison of B. chauvoei strains of cattle and sheep. *Jl. Infec. Dis.,* **42**, 84-92.

KARMANN, P. — 1930 — Die Gasoedeme unserer Haustiere, ihre Diagnose und Bekämpfung. *Münch. Tierärztl. Wochens.,* **81**, 337-341.

KLOCKER, L. — 1932 — Zur Brauchbarkeit der anaeroben Züchtungsmethode nach Fortner für die Rauschbranddiagnose. *Centr. f. Bakter.,* I, O, **125**, 525-533.

KRANEVELD, F. C. & DJAENODIN, R. — 1938 — Anaërobe Bacillen en de door hen veroorzaakte Infecties bij de Huisdieren in Nederlandsch-Indië. XXIII,

De Diagnostiek van Boutvuur. Ned.-Indische Bladen voor Diergeneeskunde, **50**, 116-143.

LECLAINCHE, E. & VALLEE, H. — 1900 — Recherches experimentales sur le charbon symptomatique. *Annal. Inst. Pasteur*, **14**, 513-534.

MARSCH, H., WELSH, H. & JUNGHERR, E. — 1928 — Blackleg in sheep. *Jl. Amer. Vet. Med. Assn.*, **74**, 63-88.

MIESSNER, H. & SCHOOP, G. — 1930 — Gasoedeme der Haustiere. *Ergebn. der Hygiene, Bakter., Immunitätsf. u. exper. Therapie*, **11**, 447-498.

MIESSNER, H. & SCHOOP, G. — 1934 — Die Fortner-Methode in der Diagnostik der Gasoedembazillen. *Deut. Tierärtzl. Wochens.*, pg. 321.

MIHALESCU, M. — 1934 — Le probleme des oedemes gazeuses des bovides. These apresentada ao 12.º Congr. Veter., New York 1934.

PFEILER, W. & GOERTTLER, V. — 1922 — Die Rauschbranddiagnose durch einen komplizierten Tierversuch, dargestellt an einem Falle aus der Praxis. *Centr. Bakter.*, I, O, 88, 472-474.

RAEBIGER, H. & SPIEGEL, A. — 1924 — Der Rauschbrand der Schafe. *Ztschr. Infektkh. d. Haust.*, **26**, 208-235.

ROCHA-LIMA, H. — 1906 — Peste da manqueira ou carbunculo symptomatico. *Pub. do Instituto Oswaldo Cruz*, Besnard Fréres, Rio de Janeiro.

RODRIGUES, C. — 1936 — Estudos sobre o Cl. chauvoei. Variações na morphologia das colonias. *Arch. Inst. Biologico*, S. Paulo, **7**, 235-244.

ROTTGARDT, A. — 1927 — Cit. Weinberg, Nativelle & Prevot, 1937.

ROTTGARDT, A. — 1932 — Carbunclo sintomatico de los ovinos a bacilo Chauvoei, typo ovino y bovino. *Bol. del Minist. de Agric. de la Nacion Argentina*, **31**, 101.

RUPPERT, F. & ROTTGARDT, A. — 1926 — Rauschbrand und kein Pararauschbrand. *Deut. Tierärtzl. Wochens.*, **34**, 604.

SASAKI, S. — 1934 — Anaerobe Bakterien im Boden. *Centr. Bakter.*, I, O, **131**, 211-212.

SCHLEICH, A. — 1925 — Zur Frage der Resistenz der Rauschbrandsporen gegen Fäulniss. *Deut. Tierärztl. Wochens.*, pg. 503.

SCHREIBER, F. — 1933 — Die Rauschbranddiagnose mit dem Fortner-Verfahren. Vet. Med. Diss., Giessen 1933. (Ref. in *Centr. f: Bakter.*, Ref. **116**, 318.

WAKAMATSU, Y. — 1934 — Ueber die Brauchbarkeit der Fortnerschen Methode für die Kultur der Rauschbrand-und Pararauschbrandbazillen. *Deut. Tierärtzl. Wochens.*, pg. 321.

WEINBERG, M. & DAVESNE, J. — 1935 — Anticorps du serum normal vis-a-vis du B. chauvoei et du Vibrion septique. *Presse Medicale*, pg. 611.

WEINBERG, M. & GINSBOURG, B. — 1927 — Données recents sur les Microbes Anaerobes, etc. Masson & Cie., editeurs, Paris.

WEINBERG, M. & MIHAILESCU, M. — 1929 — Recherches sur le Charbon Symptomatique. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, **43**, 1408-64.

WEINBERG, M. NATIVELLE, R. & PREVOT, A. R. — 1937 — Les Microbes Anaerobies. Masson & Cie., editeurs, Paris.

WOLTERS, K. L. & DEHMEL, H. — 1928 — Zur Züchtung und Differenzierung der aneroben Sporenbildner unter besonderer Berücksichtung der Rauschbrand-und Pararauschbrandbazillen. *Centr. Bakter.*, I, O, **108**, 264-75.

ZEISSLER, J. & RASSFELD, L. — 1928 — Die anaerobe Sporenflora der europäischen Kriegsschauplätze 1917. Verlag Fischer, Jena.

ZELLER, H. — 1925 — Cit. por Weinberg, Nativelle & Prevot, 1937.

———o———

# ILUSTRAÇÕES DAS DOENÇAS CAUSADAS POR "ELSINOË" E "SPHACELOMA" CONHECIDAS NA AMERICA DO SUL ATÉ JANEIRO DE 1936 (1)

POR

Anna E. Jenkins e A. A. Bitancourt

Do Bureau of Plant Industry, Department of Agriculture, dos Estados Unidos e do Instituto Biologico de São Paulo

Com as estampas 1-11

O trabalho dos autores intitulado «Doenças das plantas causadas por fungos dos generos *Elsinoë* e *Sphaceloma*» (57) contem um paragrafo e uma tabela sinóptica (Tabela 2) referentes às 13 doenças desse grupo conhecidas na America do Sul até Janeiro de 1936. O presente trabalho, complemento do anterior, reune, de acordo com o plano original, ilustrações referentes a todas essas doenças. Nele foram incluidos igualmente dados suplementares, na sua maioria de natureza historica, que hoje podemos acrescentar. As doenças são enumeradas na ordem sistemática dos susceptiveis adotada em «Die Pflanzenfamilien», de ENGLER e PRANTL (30), de acordo com o que se fez na tabela 2 do trabalho acima citado. Uma tabulação um tanto diferente dessas doenças, ou seja na ordem em que foram assinaladas na America do Sul, foi preparada para o presente trabalho. No texto está mencionada uma doença suplementar, a antracnose do pecan *(Elsinoë randii)*, de que tinham sido colhidos especimens em 1935, embora a doença sómente tenha sido identificada quasi dois anos mais tarde (58).

Nas secções referentes às verrugoses da laranjeira azeda e da laranja doce, os autores utilisaram-se das observações, em parte ainda ineditas, de FAWCETT e BITANCOURT (34, 35) sobre as doenças dos Citrus na America do Sul.

## ANTRACNOSE DO CHOUPO
### causada por *Sphaceloma populi* (SACC.) JENKINS.

Estampa 1

Em Janeiro de 1936, a área geográfica da antracnose do choupo *(Populus* spp.) na America do Sul foi dada como compreendendo a Argentina e o Brasil (57). Posteriormente foi encontrada a menção por

(1) Trabalho apresentado pelo primeiro autor na 28.ª reunião anual da American Association for the Advancement of Science na sessão conjunta das Phytopathological Society of America e Mycological Society of America em Indianapolis, Indiana, Estados Unidos, 30 de Dezembro de 1937.

SPEGAZZINI (85), da ocorrencia comum da doença em 1909 sobre folhas de choupo preto *(Populus nigra* L.) em Baía Corral, no Chile. A sua primeira descoberta da doença na Argentina data de 1880, em Boca del Riachuelo, Buenos Aires (83) ([2]). Em ambas as publicações o fungo é designado por *Hadrotrichum? populi* SACC. nome sob o qual era então conhecido.

Que a antracnose do choupo continúa sendo uma doença grave na Argentina (Est. 1, A), se depreende do trabalho de FRESA (37) sobre o surto de ferrugem *(Melampsora larici-populina* KLEB.) do choupo da Lombardia na região do Delta do Paraná em 1935. FRESA menciona a antracnose entre diversas outras doenças do choupo constatadas nessa região e que em certos casos eram mais sérias do que a propria ferrugem. Mais ou menos na mesma época, na Australia, a antracnose foi citada como um exemplo de patógenos do genero *Sphaceloma* cuja introdução devia ser evitada naquele país (4).

Culturas de *Sphaceloma populi* foram obtidas em Maio de 1935 pelo segundo autor, a partir de folhas de choupo provenientes de Minas Gerais, Brasil (Est. 1, B).

## VERRUGOSE DE IRESINE

### causada por *Elsinoë amazonica* SYDOW

Estampa 2, A e B.

O especimen tipo (88) de verrugose de *Iresine* ilustrado na estampa 2, figs. A e B, foi emprestado por SYDOW para estas fotografias. SYDOW comunicou ([3]) que a especie é *Iresine argentata* D. DIETR. e que o mesmo fungo se encontra em dois especimens da mesma planta, provenientes de Porto Rico (A. A. HELLER n.º 4522, 2 de Fevereiro de 1900 e P. SINTENSIS. Plantae Portoricensis 3889, Guanica, Porto Rico, 9 de Março de 1886) no herbario do Museu Botánico de Dahlem, Alemanha. O ultimo especimen, no exemplar do National Herbarium dos Estados Unidos, tambem apresenta numerosas lesões de verrugose.

## VERRUGOSE DO ABACATEIRO

### causada por *Sphaceloma perseae* JENKINS.

Estampa 3

Acredita-se que o agente causador desta doença do abacateiro *(Persea* spp.) tenha sido introduzido no Brasil ha dez anos, aproximadamente, em mudas da Flórida, Estados Unidos (14). As mudas dessa

([2]) As referencias bibliográficas citadas no nosso trabalho anterior, complementar do presente, estão marcadas com um asterisco (*) em seguida ao numero da referencia, na «bibliografia» do presente trabalho.
([3]) Carta de 3 de Dezembro de 1938 ao primeiro autor.

proveniencia foram plantadas em Limeira (Estado de São Paulo) Viçosa (Estado de Minas Gerais) e Deodoro (Distrito Federal). Nesta ultima localidade as mudas introduzidas não foram, pelo menos a principio, multiplicadas, e não consta que a verrugose tenha sido encontrada até hoje nos poucos pés alí plantados.

Em São Paulo, entretanto, a doença já parecia grassar com intensidade em 1931, quando especimens foram colhidos num viveiro de Limeira por GONÇALVES (54, tab. 2, nota 2). A identificação, porém, sómente foi feita em 1932 quando MÜLLER (54) e BITANCOURT (54) ([4]) a observaram em Limeira.

MÜLLER menciona que em São Paulo encontrou a doença sómente em abacateiros originarios da Flórida e não em variedades nativas, conforme foi notado anteriormente (54). BITANCOURT, entretanto, no mesmo ano e na mesma localidade, colheu especimens de verrugose sobre abacateiro de pé franco, nacional, isto é, do grupo das variedades antilhanas, *(Persea americana* MILL.) (Est. 3, A e B).

De Limeira, a doença foi transmitida a numerosas localidades do Estado, tendo o segundo autor dado a sua distribuição conhecida em 1936 (14), assim como indicações relativas à susceptibilidade das diversas variedades de abacateiro (15). Em Bertioga o primeiro autor observou a verrugose em Maio de 1936, em mudas da mesma proveniencia. Após varios anos de crescimento naquela localidade isolada, os pés estavam bem desenvolvidos e traziam frutas gravemente afetadas.

Em Minas Gerais, MÜLLER constatou, em 1934, um pequeno grâu de infecção nos viveiros da Escola Superior de Agricultura, de Viçosa, num certo numero de pés francos de variedade antilhana e em enxertos de Winslow (54). Tentou-se erradicar a doença, mas no principio de 1936, quando os viveiros foram examinados por MÜLLER, JENKINS e BITANCOURT, algumas infecções foram observadas. MÜLLER escreveu posteriormente que «a safra seguinte de frutas tinha verrugose e as arvores tiveram que ser pulverizadas». (Est. 3, C e D).

Até o presente, ao que saibamos, em Minas Gerais a verrugose do abacateiro sómente é conhecida em Viçosa, o que corrobora a suposição de que a doença tenha sido introduzida no Brasil, em mudas provenientes da Flórida e plantadas, entre outros lugares, naquela localidade mineira.

Em 1936, a verrugose foi encontrada no Estado do Rio de Janeiro e no Distrito Federal (9) e no ano seguinte criou alarme a sua descoberta em São Leopoldo, Rio Grande do Sul (36). Em diversas publicações (21, est. 2, C e D, 54) a verrugose do abacateiro foi ilustrada

---

([4]) No citado artigo, a data dos especimens colhidos por BITANCOURT foi erradamente dada como Setembro de 1933, quando deveria ter sido Setembro de 1932.

em frutas de diversas idades e de diferentes proveniencias. Um dos citados trabalhos contem uma figura das frutificações conidianas do organismo causal (21, est. 2, E).

Sem que isto tenha sido apurado em todos os casos, tudo indica que São Paulo foi o principal centro de disseminação da verrugose do abacateiro no Brasil, pois, de acôrdo com um inquerito feito pelo Instituto Biologico de São Paulo, dos viveiros doentes de Limeira foram expedidas mudas para os Estados de Ceará, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Baía, Espirito Santo, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Goías, Minas Gerais e tambem para a Argentina. Esse fato determinou em S. Paulo, em 1936 (5), que se aplicassem ao abacateiro as medidas de defesa sanitaria vegetal previstas pelo Regulamento baixado com o Decreto 15.198, de 21 de Dezembro de 1921 (1). As mudas destinadas a outros Estados, provenientes de viveiros anteriormente doentes, porém tratados e aparentemente sãos, são quarentenadas por um periodo correspondente a um surto vegetativo, findo o qual são examinadas antes de se conceder o certificado de sanidade.

No Perú a doença foi assinalada por Abbott (8), mas, de acôrdo com uma sua carta ao primeiro autor, seria desejavel que a ocorrencia da doença nesse país fosse confirmada por especimens seguramente identificados.

Na Argentina, Bitancourt e Fawcett não encontraram, em 1937, nenhum vestigio da doença em abacateiros examinados em Bella Vista, Corrientes e em Tucuman, provincia de Tucuman.

### ANTRACNOSE DA MACIEIRA E DA PEREIRA
### causada por *Elsinoë piri* (Wor.) Jenkins

Estampa 4, A e D.

Conforme foi mostrado em 1932 num historico de *Elsinoë piri* (50) *Gloeosporium pirinum* descrito por Peglion sobre pereira *(Pyrus communis* L.) na Italia, é a forma conidiana deste ascomiceto. Mencionou-se, então, que 8 anos antes, Marchionatto (65) tinha descoberto *G. pirinum* sobre pereira na Argentina (Est. 4, A). Nessa publicação, que assinalava pela primeira vez a existencia da antracnose da pereira e da macieira *(Pyrus malus* L.) na Argentina, Marchionatto afirmava que a doença era muito prejudicial e distribuida em toda a provincia de Buenos Aires e as ilhas do Delta do Paraná. Em 1934, referindo-se à doença sob o nome de antracnose da macieira, ele (66) afirma que nesse ano a doença fôra observada pela primeira vez nas folhas e frutas de macieiras da provincia de Buenos Aires.

Em 1937 a doença foi observada por FAWCETT e BITANCOURT em folhas de macieira no Delta do Paraná (29 de Abril) e em folhas desse mesmo hospede (Est. 4, D) e tambem em folhas de pereira, em La Plata (2 de Maio). Os especimens de La Plata eram da Faculdade de Agronomia, onde MARCHIONATTO (65) tinha descoberto a doença em folhas de pereira em 1923-24.

O fungo foi isolado pelo segundo autor, das folhas dos dois hospedes, sendo essa, ao que se saiba, a primeira vez que *E. piri* é isolado da pereira. Diversos isolamentos tinham sido feitos anteriormente de frutas de macieira da Europa, conforme já foi mencionado (50) e GRODSINSKY escreveu em 1934, da Argentina, que tinha isolado o fungo da macieira ([5]).

## ANTRACNOSE DE RUBUS
### causada por *Elsinoë veneta* (SPEG.) JENKINS

Estampa 5, A.

A estampa 5, A representa, ao que se saiba, a primeira descoberta desta doença na Argentina, o que sucedeu em 1932, quando MARCHIONATTO (67) a encontrou em *Rubus ulmifolius* SCHOTT. e *R. idaeus* L. Os especimens por ele então colhidos são mencionados em trabalho anterior dos autores (57, tab. 2, nota 3).

## ANTRACNOSE DA ROSEIRA
### causada por *Sphaceloma rosarum* (PASS.) JENKINS

Estampa 4, C.

A antracnose da roseira (*Rosa* spp.) é uma das doenças dessa planta mais espalhadas no mundo (60) e, igualmente, uma das mais espalhadas entre as doenças causadas por especies de *Elsinoë* ou *Sphaceloma* (51). Descoberta em 1881 por PASSERINI que designou o seu agente por *Phyllosticta rosarum,* a sua identificação como doença causada por um fungo do genero *Sphaceloma* só foi feita muitos anos mais tarde (51), em 1932, quando foi reconhecido que a mancha da folha assinalada na Argentina por MARCHIONATTO (65) era a antracnose da roseira No Brasil a doença é conhecida em Minas Gerais (70), São Paulo (16) e no Distrito Federal onde o primeiro autor colheu especimens em 1936. A existencia da doença na Venezuela é comprovada por um especimen proveniente de Caracas, datado de 24 de Setembro de 1937, colhido por MÜLLER e recentemente enviado ao primeiro autor.

---

([5]) Carta a A. E. JENKINS datada de 17 de Abril.

## VERRUGOSE DE CALOPOGONIUM
causada por *Elsinoë calopogonii* Sydow

Estampa 2, C.

Como no caso da verrugose de *Iresine,* a presente ilustração foi feita com o especimen tipo (Ule 3525), emprestado por Sydow, que recentemente comunicou ter encontrado lesões da doença sobre especimens de *C. coeruleum* colhidos por Ule (Ule 5645) em outro lugar do Perú, além da localidade tipo (88).

## VERRUGOSE DA LARANJEIRA AZEDA
causada por *Elsinoë fawcetti* Bitancourt e Jenkins

Estampa 6.

O fato de existirem na America do Sul dois tipos diferentes de verrugoses dos Citrus, a da laranjeira azeda causada por *Elsinoë fawcetti* e a da laranja doce, causada por *Elsinoë australis,* que foram devidamente distinguidas uma da outra sómente em 1933 (53) torna assás dificil o exame critico da literatura referente a essas doenças anterior a essa data. Essa literatura acha-se espalhada em diversas publicações e é muito fragmentaria, mas na medida em que ela pode ser interpretada, apresenta utilidade no estudo histórico dessas doenças cuja fase inicial tão pouco se conhece.

### BRASIL

E' incontestavelmente à verrugose da laranjeira azeda *(Citrus aurantium* L.) e à verrugose da laranjeira doce *(Citrus sinensis* Osb.) que Averna Saccá se refere (10) quando, sob o titulo «Lasiodiplodia citri Averna», descreveu a doença que diz ser o *Citrus canker.* A fig. 339 do seu trabalho não deixa a menor duvida a esse respeito, pois nela se distinguem as pústulas da verrugose da laranjeira azeda sobre uma folha dessa especie de Citrus. Em 1936 os autores tiveram a oportunidade de verificar que o especimen de Citrus com a etiqueta «Cancro citrico» colhido por Averna Saccá para o museu por ele organizado nos laboratorios da cadeira de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura de Piracicaba, Estado de São Paulo e conservado numa solução de formol, é sem sombra de duvida exemplar de verrugose da laranjeira azeda. A etiqueta não traz data mas o exemplar é com certeza anterior a 1926. O fato de até hoje nenhuma confirmação ter sido dada, da existencia do cancro citrico em São Paulo, é suficiente para demonstrar que não foi esta ultima doença a que Averna Saccá observou e descreveu.

Em seu trabalho AVERNA SACCÁ declara: «Em 1913 colecioná-mo-la sobre algumas plantas de laranjeiras, em diversas chacaras de Piracicaba. Durante o mês de Outubro do mesmo ano mostrou-se tambem nos viveiros e no pomar da Escola sobre o limoeiro siciliano, as laranjeiras baíana, pêra, natal, serra d'agua, etc. Até hoje não a encontrámos nas mexeriqueiras, mas está difundida aparecendo uma ou outra vez sobre o caule e os espinhos de *Citrus trifoliata*». A' luz dos conhecimentos atuais sobre as verrugoses dos Citrus no Estado de São Paulo e sobre os seus hospedes habituais, é licito concluir que desta lista de plantas atacadas, a doença que atacava o limoeiro siciliano (*Citrus limonia* OSB.) e possivelmente o *Citrus trifoliata* L. era a verrugose da laranjeira azeda, causada por *Elsinoë fawcetti*, ao passo que a doença encontrada sobre laranjeiras baíana, pêra, natal e serra d'agua (*Citrus sinensis* OSB. var.) era a verrugose da laranja doce causada por *E. australis*. A descrição da doença e do fungo que a causa e que AVERNA SACCÁ pretende ser *Lasiodiplodia citri* AVERNA, feita por ele no referido trabalho, é extremamente confusa, pois não é possivel discernir o que resulta de suas observações proprias em Piracicaba, e que portanto se refere à verrugose, do que autores norte-americanos descreveram sobre o verdadeiro cancro citrico, causado por *Phytomonas citri* HASSE (6).

Embora com toda probabilidade, a verrugose observada por AVERNA SACCÁ sobre variedades de laranja doce fosse a da laranja doce, é sabido que a da laranjeira azeda tambem pode, em raras ocasiões atacar a laranja doce. Um caso desses foi observado em São Sebastião, São Paulo, em 1937, pelo segundo autor, que isolou o fungo em cultura.

O falecido ARSENIO PUTTEMANS, que pode ser considerado sucessor de NOACK, como pioneiro da fitopatologia no Brasil, era um ardoroso colecionador de fungos, especialmente de São Paulo, onde iniciou as suas atividades em 1898. Na sua historia de fitopatologia no Brasil (78), ele afirma, em relação á verrugose da laranjeira azeda, que a doença não podia ter existido no Brasil, pelo menos nos Estados centrais, antes de 1913 e que devia ter sido introduzida entre essa data e 1920. Escreve que não poderia ter deixado de notar a existencia de uma doença tão caracteristica, que «chamou a minha especial attenção, quando a vi pela primeira vez em viveiros de laranja azeda na Escola de Piracicaba, creio que em fim de 1920, depois da minha volta da Europa, onde tinha permanecido durante a Grande Guerra». Conforme

(6) O presente trabalho já se achava no prélo quando saío uma publicação de R. AVERNA SACCÁ (Contribuição para o estudo das doenças nas plantas citricas. O Solo (Piracicaba). 30: 30-41. 1938 (1939)) em que o referido autor, sem citar a publicação anterior (10) declara que encontrara *Lasiodiplodia citri* em 1913 associado á verrugose, «o que me levou a pensar ser a causa desta praga até então muito incerta, bastante discutida entre os phytopathologistas.»

vimos, a doença foi descoberta, sinão identificada, por AVERNA SACCÁ, em 1913, em Piracicaba. No seu artigo histórico que acabamos de citar, PUTTEMANS mencionou que no herbario do Instituto de Biologia Vegetal do Rio de Janeiro ([7]) ha um especimen de verrugose da laranjeira azeda datado de 1918 e acrescenta que ele mesmo encontrou a doença no Distrito Federal em 1922. O referido especimen tem o numero 1542 e foi colhido em Deodoro por A. CAIRE em 3 de Abril de 1918 ([8]). No herbario de A. PUTTEMANS, hoje propriedade da Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro, ha um especimen de Alcantara, E. do Rio, com data de 1922 (71).

Em 1923, uma portaria do Ministro da Agricultura considerava zonas infetadas de verrugose das laranjeiras, cidreiras, etc., o Distrito Federal e o Municipio de Niterói no Estado do Rio de Janeiro e proíbia o transito e exportação dessas plantas sem certificado de sanidade passado pelo Serviço de Vigilancia Sanitaria Vegetal (64).

Quando da publicação do trabalho de CARVALHO (29) sobre as podridões dos Citrus em 1932, já havia mais ou menos um ano que a atenção estava sendo chamada em São Paulo para a verrugose da laranja doce. Ele tratou da doença, incluindo-a com a verrugose da laranjeira azeda, pois sómente em 1933 (53) foi estabelecida a distinção entre as duas doenças que no mesmo ano (18) e no ano seguinte (13) foram tratadas pelo segundo autor em suas publicações sobre as doenças dos Citrus. O ano de 1935 estabeleceu um marco na historia da verrugose da laranjeira azeda, pois nele se descobriu em São Paulo a forma perfeita do fungo parasita, que foi descrito sob o nome de *Elsinoë fawcetti* (20).

Coleções de especimens de verrugose da laranjeira azeda sobre diferentes especies de Citrus, foram feitas em 1932 por CARLOS WRIGHT na Estação Experimental de Limeira e enviadas ao primeiro autor, que as incluiu nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry, Departamento da Agricultura dos Estados Unidos.

Fóra do Estado de São Paulo, a verrugose da laranjeira azeda foi assinalada na Baía (25) em 1929. Posteriormente (3) foi assinalada a existencia da doença no Rio Grande do Sul desde 1923. As observações de MÜLLER (68) sobre a doença em Minas Gerais, em 1933, foram provavelmente baseadas principalmente nos Citrus cultivados na Escola Superior de Agricultura de Viçosa. Ele informa que uma infecção, que variava de moderada a grave, foi constatada nas seguintes variedades: limoeiro de Genova, limoeiro rugoso, limeira antilhana, limoeiro cravo e laranjeira agridoce. Acrescenta que no caso destas

---
([7]) Hoje incorporado ao Serviço Florestal.
([8]) Carta de D. W. Pacca, ao segundo autor.

duas ultimas especies, observaram-se 100 por cento de infecção em viveiros. No caso do limoeiro cravo, não fôra até então encontrado galhos e frutas. MÜLLER ainda informa que o pomelo e a laranja um só pé adulto que não estivesse gravemente atacado nas folhas, doce não apresentavam a doença em Viçosa, que era entretanto conhecida nesses hospedes no visinho Estado de São Paulo. A referida doença na laranja doce, é naturalmente a verrugose da laranja doce, pela primeira vez distinguida da verrugose da laranjeira azeda, num trabalho mais ou menos contemporaneo do de MÜLLER. Em Viçosa, ROLFS colheu especimens de verrugose da laranjeira azeda em 1932 e os enviou ao primeiro autor.

Quando FAWCETT *et al.* (33) e FAWCETT e BITANCOURT (34) fizeram as suas observações sobre as doenças dos citrus no Brasil em 1936-1937, encontraram a verrugose da laranjeira azeda em todos os Estados visitados, isto é, Minas Gerais, Distrito Federal, Rio de Janeiro (33), Pernambuco, Baía, São Paulo e Rio Grande do Sul (34).

Especimens de verrugose da laranjeira azeda provenientes dos Estados da Paraíba, Espirito Santo e Paraná, constam do herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo. No mesmo herbario a doença está representada em especimens de laranja azeda, laranja doce, laranja cravo *(C. sinensis* OSB. x *C. nobilis* LOUR.), satzuma *(C. nobilis unshiu* Sw.), limão comum, limão doce e limão rugoso *(C. limonia* OSB.), limão cravo *(C. aurantifolia* Sw.), lima de Taíti e lima de umbigo *(C. aurantifolia* Sw.), pomelo *(C. grandis* OSB.), tangelo *(C. grandis* x *C. nobilis)* e calamondine *(C. mitis* BL.).

### OUTROS PAÍSES SUL-AMERICANOS

De acordo com o que se depreende da literatura pertinente, a verrugose da laranjeira azeda foi descoberta pela primeira vez em diversos lugares na Argentina em 1919 e 1920.

Em Tucuman, a doença foi observada em 1920 por G. L. FAWCETT (31) que já estava familiarisado com os seus sintomas na America do Norte, como eles ocorrem nos Estados Unidos. Assinalando a existencia da doença na Argentina, salienta as notaveis deformações que ela produz, e apresenta ilustrações de galhos de laranjeira azeda e frutas de limoeiro. Embora a verrugose da laranjeira azeda não tivesse sido encontrada quando certas inspecções foram feitas em 1916-17, a doença estava em 1920 mais ou menos geralmente distribuida nos viveiros de Tucuman. Devia estar bem estabelecida na «quinta de la Escuela Nacional de Tucumán» em 1917, de onde foi distribuida, em «arbolitos de *C. salicifolia*» a um viveiro da provincia onde foi notada no ano seguinte.

G. L. Fawcett menciona o fato da doença não ter sido assinalada por Spegazzini nas suas publicações micológicas sobre os fungos de Tucuman e outras partes do país. Ele acabava de ter comunicação de Spegazzini de que no ano anterior este ultimo descobrira a doença no Paraguay e recebera igualmente especimens de Misiones, na Argentina. Conforme veremos, ha hoje dúvidas quanto á verdadeira identidade da doença no Paraguay.

E' possivel que os especimens de Misiones tivessem sido colhidos por Hauman, pois em seu relatorio sobre a doença no Paraguay, Spegazzini (87) afirma que ela tinha sido encontrada em Misiones (Argentina) por Hauman. Em 1920, Hauman e Parodi (45) tambem encontraram a doença em La Plata, onde, segundo afirmam, ela atacava as folhas e frutas, especialmente da laranjeira azeda e do limoeiro. Ilustrações coloridas da verrugose da laranjeira azeda na Argentina foram publicadas por Blanchard em 1930 (24, est. 7, fig. 1, *a-c*). A laranja representada na mesma estampa (Est. 7, fig. 1, *d*) está evidentemente atacada de verrugose da laranja doce, doença então pouco conhecida e ainda não distinguida da outra verrugose.

Conforme já foi mencionado (21), Müller, em 1932, numa viagem que fez á Argentina, inclusive a Tucuman, constatou que a verrugose da laranjeira azeda era comparativamente rara, ao passo que a da laranja doce era abundante.

E' essa mais ou menos a situação encontrada por Fawcett e Bitancourt (35) em Abril e Maio de 1937. Eles observaram a doença em Corrientes, provincia de Corrientes, Pindapoy, territorio de Misiones, Concordia, provincia de Entre-Rios e Tucuman, provincia de Tucuman e no Uruguay em Salto. Em todas essas localidades a verrugose da laranjeira azeda foi observada em viveiros de laranjeira azeda, e tambem em Concordia em viveiros de limoeiro e em Pindapoy em viveiros de pomelo. E' interessante notar que os mesmos autores não observaram a doença em grandes e velhos pés francos de laranjeira azeda que existem em quasi todas as localidades por eles visitadas e onde geralmente a verrugose da laranja doce atacava as frutas com intensidade. A existencia da verrugose da laranjeira azeda sómente em plantas novas parece indicar que esta doença, pelo menos em algumas das localidades mencionadas, é de introdução relativamente recente.

Além dos países sul-americanos acima citados, a verrugose da laranjeira azeda é conhecida na Venezuela, de onde Müller enviou ao primeiro autor um especimen por ele colhido em Caracas em 1937 e na Guyana Holandêza, de acordo com o especimen proveniente de

Paramaribo e datado de 1 de Setembro de 1934, colhido e enviado por STAHEL a H. S. FAWCETT, que o comunicou ao primeiro autor.

No Paraguay, SPEGAZZINI (87) assinalou em 1919 a existencia de uma verrugose sobre limeira. Conforme veremos na secção referente á verrugose da laranja doce, ha serias dúvidas sobre si a doença por ele constatada nos arredores de Asunción é a verrugose da laranjeira azeda conforme se poderia depreender da citada publicação (87). Em sua viagem ao Paraguay em 1937 FAWCETT e BITANCOURT encontraram em abundancia a verrugose da laranja doce sobre diversos hospedes, conforme veremos adiante, mas não observaram um só caso de verrugose da laranjeira azeda em todas as suas excursões, não sómente nos pomares visitados, como tambem no mercado de Asunción e em feiras na beira dos caminhos onde quantidade de frutas se achavam expostas á venda, provavelmente de uma grande quantidade de pomares diferentes. Pelas observações dos citados autores é obvio que na maioria dos pomares do Paraguay não se faz o menor tratamento contra pragas e doenças. Tudo indica que o clima desse país seja tão favoravel á verrugose da laranjeira azeda quanto á da laranja doce. A experiencia que se tem da verrugose em outras localidades de clima apropriado á doença é que o mal rapidamente se espalha, sendo dificil, na ausencia de tratamentos, encontrar no prazo de alguns anos após a sua introdução, viveiros e pomares isentos da doença. E' portanto provável que, mesmo que a verrugose da laranjeira azeda tivesse sido introduzida recentemente e pouco espalhada no Paraguay no tempo de SPEGAZZINI, a doença ter-se-ia estendido de um modo quasi geral em toda a região, quando FAWCETT e BITANCOURT a visitaram em 1937.

Diante pois das dúvidas suscitadas pelas observações de SPEGAZZINI e as de FAWCETT e BITANCOURT, os presentes autores julgam preferivel considerar a existencia da verrugose da laranjeira azeda no Paraguay como ainda não comprovada.

## VERRUGOSE DA LARANJA DOCE

causada por *Elsinoë australis* BITANCOURT e JENKINS.

Estampa 8.

Nossos conhecimentos sobre a distribuição da verrugose da laranja doce na America do Sul, foram sensivelmente aumentados, depois de Janeiro de 1936, principalmente pelas observações sobre as doenças dos Citrus feitas por FAWCETT e BITANCOURT em 1937 (35). O que se segue é em grande parte baseado nas observações dos citados autores:

### BRASIL

No Brasil a distribuição da verrugose da laranja doce está limitada aos Estados do Sul. A doença acha-se generalisada no Rio Grande

do Sul, e em São Paulo a sua existencia em certas regiões parece bem antiga, pois é provavelmente á verrugose da laranja doce que se referiu NOACK (76) quando em 1900 descreveu a doença *(grind)* por ele observada sobre diferentes sortes de laranjas *(an verschiedenen Orangensorten).*

Segundo comunicou H. SYDOW ao primeiro autor ([9]), entre especimens por ele recebidos de NOACK achava-se um exemplar desse *grind,* o qual entretanto não foi conservado por tratar-se de um fungo obscuro, não identificado.

Destas regiões, portanto ha muito tempo infectadas, a doença parece estar progressivamente estendendo-se a novas zonas como Minas Gerais, — onde a verrugose da laranja doce ainda é rara, pois só foi constatada em Jacutinga (21), — Distrito Federal onde, em Inhoaíba, FAWCETT e BITANCOURT constataram um forte ataque das folhas (Est. 8, I), e Estado do Rio de Janeiro, onde a introdução da doença se fez nestes ultimos anos (21,33). Ao norte de Minas Gerais e do Estado do Rio de Janeiro, a verrugose da laranja doce não parece ter-se ainda estendido, pois FAWCETT e BITANCOURT não a encontraram em Pernambuco e Baía em 1937 (34).

### ARGENTINA

Na Argentina a existencia da verrugose da laranja doce em laranja azeda, em Tucuman, foi assinalada pela primeira vez por G. L. FAWCETT (32) que em 1931 já notara a existencia de dois tipos de verrugoses, afirmando: «En Tucumán hay dos formas de la verruga: la de los naranjos dulces y la de los limones, las cuales difieren en cuanto a las especies de Citrus que atacan y, al parecer, con respecto a los organismos que las producen». FAWCETT distingue a verrugose da laranja doce que ataca tambem as frutas de laranjeira azeda e de tangerineira, da verrugose do limoeiro, que tambem ataca o limoeiro silvestre e a laranjeira azeda, tanto nas frutas como nas folhas, sendo esta ultima a doença encontrada nos viveiros de laranjeira azeda, verificando-se igualmente em alguns casos no pomelo. Em 1936, G. L. FAWCETT enviou especimens de verrugose da laranja doce em laranja azeda (Est. 8, G e H), ao primeiro autor, que isolou o fungo em cultura. Em sua viagem de 1937, H. S. FAWCETT e BITANCOURT (35) encontraram a doença em todas as regiões visitadas: diversas localidades na provincia de Corrientes e no territorio de Misiones, Concordia, na provincia de Entre Rios, a região do Delta do Paraná, La Plata e Buenos Aires, na provincia de Buenos Aires e Tucuman na provincia de Tucuman. Em todas essas regiões, além de atacar numerosos outros Citrus, além da laranja doce, a verrugose da laranja doce é uma das mais serias

([9]) Carta de 9 de Janeiro de 1939.

doenças, contribuindo para desfigurar as frutas em proporções consideraveis. Especimens de verrugose da laranja doce provenientes de Corrientes, trazendo datas de 1928 e 1934 estão representados na estampa 8, B, C e F, respectivamente.

PARAGUAY

A historia da verrugose da laranja doce e do seu agente patógeno no Paraguay, como no resto da America do Sul, começa com um fragmento de casca de laranja doce colhida por Balansa em Villa Rica em Janeiro de 1882. Este especimen que evidentemente passou despercebido até 1931 (49, p. 548) foi, desde então, citado em diversas ocasiões, em relação ao estudo do fungo e da doença por ele causada (21, p. 3; 53, nota 11; 57, p. 479) e representado com sua respectiva etiqueta (59). Os autores tambem representaram em outra publicação acérvulos desse velho especimen que é igualmente reproduzido no presente trabalho (Est. 8, A). Quando Fawcett e Bitancourt (35) fizeram as suas observações sobre as doenças dos Citrus no Paraguay em Abril de 1937, tiveram oportunidade de examinar laranjas doces vendidas na estação de estrada de ferro de Villa Rica, atacadas da verrugose da laranja doce. Essas frutas éram provavelmente provenientes da cidade ou seus arredores e as cascas cobertas de lesões das laranjas adquiridas dos vendedores da estação constituem hoje um especimen que atesta a ocorrencia da doença nessa região mais de meio seculo depois de sua descoberta por Balansa.

A verrugose que, segundo uma publicação de Girardi datada de 1922, citada anteriormente pelos autores (57), estaria presente numa forma benigna sobre laranjas doces no Paraguay desde 1892 é provavelmente a mesma doença dos especimens de Villa Rica, o de Balansa, ha tantos anos esquecido, e os recentemente obtidos por Fawcett e Bitancourt.

Em 1919 Spegazzini visitou o Paraguay e fez um estudo especial das doenças e dos fungos das «Aurantiáceas», as quais, conforme ele declara, eram abundantes e, como era sabido, tinham importancia económica de primeira ordem para o povo paraguayo. No seu trabalho, publicado no ano seguinte (87), uma das 5 doenças de que ele trata detalhadamente é as «verrugas de las hojas o sarna encarnada». Ele explica que observara a doença sómente sobre «lima» *(Citrus limetta* Riss.) que era raramente atacada, mas que citricultores tinham lhe informado que os «limones» *(C. limonium* Riss.), as «toranjas» *(Citrus medica* Riss.) e a «naranja dulce» *(C. aurantium* Riss.) eram igualmente afetadas, bem que ele não tivera a oportunidade de verificar essas afirmações. Segundo Spegazzini, a doença produz «daños de bastante

consideración, aunque no se pueda sentar un juicio definitivo por ser una plaga de importación relativamente reciente, sobre la qual los agricultores no tienen opinión formada».

Os autores acreditam que as informações colhidas por Spegazzini sem dúvida se referiam à verrugose da laranja doce, sobre frutas. No tempo em que ele fez as suas observações sobre os Citrus em Asunción e sua visinhança, sómente era conhecida a verrugose da laranja azeda e é natural que acreditasse fosse essa a doença dos Citrus que alí ocorria. Na parte micológica de seu trabalho (87, p. 185 a 186) Spegazzini indica que as folhas onde descobriu a verrugose eram de limeira e provinham de «una quinta a mitad camino entre San Lorenzo y San Antonio». Ele tambem menciona que era o mês de Outubro e ao descrever o aspéto das lesões, antes de dar os caracteres microscopico do fungo imperfeito que nelas encontrou, diz que observou tambem a doença em galhos e frutas novas [10].

Spegazzini não citou o numero de herbario do especimen que colheu no Paraguay, mas como as suas coleções estão hoje no Instituto Spegazzini, do Museu de La Plata, foi ele solicitado do Dr. J. Lindquist, diretor do Instituto, que gentilmente o cedeu ao segundo autor. O especimen traz o numero 3352 e, como os outros do herbario do cientista italiano, acha-se contido num pequeno envelope quadrado que traz desenhos do fungo, a fino traço de lapis (Est. 7, A). E' preciso notar que ao passo que Spegazzini afirmou que tinha observado o fungo sómente em limeira, — muito provavelmente a limeira da Persia, — o rotulo do especimen, escrito de seu proprio punho (Est. 7, A) dá como hospede *Citrus aurantium,* nome latim por ele usado para a laranja doce. Não parece haver dúvidas, entretanto, que seja este mesmo o especimen sobre o qual Spegazzini baseou sua descrição. A localidade indicada é San Antonio e a data Outubro de 1919 e além disso em uma das duas folhas do especimen, que estão gravemente afetadas pela doença

---

[10] Para completar as referencias ao trabalho de SPEGAZZINI, transcrevemos abaixo a parte referente ás lesões e ao fungo da verrugose:

«Las hojas (y a veces también las ramitas tiernas y los frutos jóvenes) ofrecen, por lo general, un tinte clorótico amarillento difundido, rara vez y tan solo a la vejez pueden ostentar manchas parduscas indefinidas; su superficie está siempre fuertemente abollada y casi arrugada, pues la afección al principio afecta las nervaduras que cesan de crecer en armonía con el parénquima intermediario. Las verruguitas aparecen primero en la cara inferior, haciendo erupción sólo mas tarde y en menor cantidad tambien en la superior; al iniciarse son muy pequeñas y muy poco salientes casi puntiformes, pero más tarde o se refunden varias juntas o proliferan formando nódulos de 1 a 2 milímetros de diámetro y de altura con la superficie granulosa, casi como una coliflor, de un hermoso color de ladrillo, simulando casi el aspecto de una Uredinacea; mientras a lo largo de las nervaduras son siempre muy irregularmente numerosas y apiñadas, por el contrario, en la lámina foliar a veces se disponen en agrupaciones concéntricas o discoidales de 5 hasta 10 milímetros de diámetro; el color carnecino o acanelado de los tubérculos juveniles se vuelve pardo en la vejez por una costra aceitunada que paulatinamente los va recubriendo; en este estado, a primera vista, uno se hallaria macroscópicamente inclinado a tomarlos por efectos de algún pequeño parásito animal. La sección microscópica de los tubérculos muestra al interior casi sólo células pseudo-esclerosas y la periferia externa se halla revestida por un tupido afelpado de hifas muy ramificadas y entrelazadas irregulares aceitunadas que se transforman en la superficie entera en una capa de esterigmas baculiformes (15-20 mic. x 4-5 mic.) levemente undulados y terminados al ápice por un pezoncilo más o menos agudo sobre el cual se desarolla un solo conidio incoloro o ligeramente ahumado alargado-trasovado (10 mic. x 4 mic.), obtuso en la extremidad superior, agudo en la inferior, al principio siempre unicelular continuo, y más tarde, muy a menudo, con un tabique transversal más o menos excéntrico, que lo divide en dos células superpuestas, cada una con un pequeño vacuolo.»

(Est. 7, B), notam-se nitidamente as lesões dispostas em circulo que ele descreveu (Est. 7, C). Num dos seus desenhos, SPEGAZZINI representa um acérvulo formando uma camada continua, escura e compacta, na face inferior da lesão (Est. 7, A). Esta mesma camada é visivel nas fotomicrografias de secções do proprio especimen (Est. 7, D). Semelhante estrutura é mais caracteristica de *Elsinoë australis* do que de *Elsinoë fawcetti*, mas os outros desenhos do envelope, como tambem a propria descrição na publicação de SPEGAZZINI, correspondem bem ao ultimo fungo. Ha pois uma dúvida acerca da verdadeira identidade do fungo do referido especimen, dúvida essa que é aumentada ainda pelo fato da verrugose causada por *E. fawcetti* ser excessivamente rara sobre a laranja doce.

As folhas do especimen de SPEGAZZINI mostram uma severa infecção da nervura principal que ele menciona em sua descrição. Observam-se os mesmos sintomas em folhas de laranja doce atacadas por *E. australis* anteriormente representadas pelos autores (21, est. 5) e que mostram igualmente lesões proeminentes nas regiões internervais. Com exceção de *Fumago oosperma* SPEG. sobre folhas de tangerineira, é este o único fungo das folhas que SPEGAZZINI assinala em toda a sua publicação. A sua indicação de que o fungo da verrugose pode atacar frutas novas é a única referencia que faz de um fungo sobre frutas cítricas. Um certo numero de fungos são assinalados sobre a laranjeira azeda e o fato de ele não mencionar a verrugose nesse hospede que é extremamente suscetivel á infecção por *E. fawcetti*, é uma forte presunção da ausencia dessa especie nos Citrus que crescem na região por ele inspecionada em Outubro de 1919.

As observações de FAWCETT e BITANCOURT (35) sobre a ocorrencia da verrugose da laranja doce e a ausencia da da laranja azeda nos Citrus que examinaram durante a sua viagem de estudo, em Abril de 1937, ainda reforçam mais as dúvidas relativas á presença de *E. fawcetti* nessa região do Paraguay. Eles visitaram diversos pomares de Asunción e seus arredores, inclusive o suburbio de San Lorenzo e encontraram em abundancia a verrugose da laranja doce sobre esta fruta e sobre frutas de limoeiro comum, limeira de umbigo, tangerineira, laranjeira azeda e limoeiro. Mais ou menos na mesma época, nos Estados Unidos, o primeiro autor tambem identificou a doença em limões importados do Paraguay (55). FAWCETT e BITANCOURT notaram que a verrugose da laranja doce atacava sempre com intensidade as frutas, sendo dificil encontrar sintomas nas folhas.

De acordo com a presente discussão pode se concluir que sem dúvida era à verrugose da laranja doce que WINKELRIED BERTONI se referiu (11) dizendo que «fué bastante distribuida para la region

Central y Sud en 1926, con mayor intensidad sobre las frutas de naranjo, mandarino y limoneros...». O Citrus designado por mandarino, é a tangerineira, *C. nobilis deliciosa* Sw.

URUGUAY

Do Uruguay, especimens da doença, provenientes de Yerbal, colhidos em Abril de 1928 (Est. 8, D) e de Montevidéo, colhidos em Maio de 1932 (Est. 8, E) foram enviados por W. HERTER a H. S. FAWCETT, que os encaminhou ao primeiro autor para classificação. FAWCETT e BITANCOURT encontraram a doença em Salto e Colonia em 1937 (35).

As observações de FAWCETT e BITANCOURT tambem aumentaram sensivelmente o numero dos hospedes do fungo da verrugose da laranja doce conhecidos em principio de 1937 (21) e que são, além das diversas variedades da laranja doce, a tangerina, a laranja cravo, o limão seda *(? C. aurantifolia* Sw.), a lima da Persia *(C. aurantifolia* Sw.), a papeda de folha pontuda *(C. hystrix* D. C.) e plantas consideradas híbridas como a tangerona e a laranja Sabará *(? C. sinensis* x *C. nobilis).* FAWCETT e BITANCOURT (35) encontraram a verrugose da laranja doce sobre limão cravo (lima de Rangpur: *C. aurantifolia* Sw.) no Rio Grande do Sul, e o fungo foi isolado por A. E. JENKINS; sobre laranja azeda em Tucuman e La Plata; sobre laranjas doce e azeda nos laranjais sub-espontaneos do territorio de Misiones, na Argentina, e no Paraguay; sobre limão comum em Concordia, na Argentina, e no Paraguay; sobre lima de umbigo no Paraguay; sobre kumquat nagami *(Fortunella margarita* (LOUR.) Sw.) em Concordia na Argentina; sobre tangelo Minneola *(C. nobilis* x *C. paradisi)* e sobre «pomelo blanco» *(C. paradisi* MACF.) em Salto no Uruguay; e sobre laranja Temple *(? C. sinensis* x *C. nobilis)* em Pindapoy, Misiones, na Argentina. A esta lista deve-se acrescentar a satzuma *(Citrus nobilis unshiu* Sw.) em São Paulo, de acordo com os especimens constantes do herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo. De todos esse hospedes o segundo autor isolou o fungo parasita em cultura.

Todas essas observações tendem a mostrar que a verrugose da laranja doce está estabelecida ha muito tempo no Paraguay, na Argentina, e possivelmente tambem no Uruguay e no Rio Grande do Sul. A essa conclusão leva igualmente o fato de FAWCETT e BITANCOURT terem encontrado a doença, com caracter quasi sempre muito grave no territorio de Misiones, Argentina, nos grandes pés francos, ás vezes quasi seculares, nas proximidades das missões jesuitas de Santo Ignacio, San Carlos e Santa Ana, e nas altas laranjeiras sub-espontaneas das florestas que margeiam o Rio Paraná.

De outro lado, a ocorrencia da verrugose da laranja doce na Argentina, Uruguay e Paraguay em um numero assás consideravel de hospedes que, em São Paulo, não se mostram atacados, mesmo nas proximidades de pés de laranjeira doce doentes, parece indicar que a introdução da doença neste Estado é de data mais recente. E' aliás possivel atualmente verificar a extensão progressiva da doença em regiões novas do Estado, como o vale do Paraíba, assim como tambem nos pomares do Distrito Federal e do Estado do Rio de Janeiro, onde não era conhecida antes de 1935.

Essa extensão progressiva da área de distribuição da verrugose da laranja doce para o norte, que se está processando sob nossos olhos, alarmou as autoridades e motivou, em 1937, a tomada de medidas de defesa sanitaria vegetal com o fim de erradicar o mal, ou pelo menos tolher a sua propagação, nos pomares do Distrito Federal e do Estado do Rio (6,7). RANGEL e GOMES (82) incluiram recentemente a doença, que ilustram com uma figura em côres, entre os peores males da laranja no Brasil.

A verrugose da laranja doce apresenta uma anomalia aparente porque é conhecida sómente na America do Sul, onde a laranjeira doce e as outras especies de Citrus não são plantas espontaneas e sim introduzidas. Duas hipoteses podem ser avançadas para explicar esta anomalia. E' possivel que *Elsinoë australis* seja o resultado da hibridação entre *E. fawcetti* e alguma outra especie de *Elsinoë*, parasita de algum genero de Rutacea indígena na America do Sul. Conforme é hoje sabido, *E. fawcetti* produz, na America do Sul, a forma sexuada até hoje não encontrada na America do Norte (20). Isto aparentemente forneceria o meio para a formação de semelhantes híbridos, um dos quais poderia ter-se perpetuado e estabilisado, o que teria dado a especie *E. australis*.

Outra hipotese seria que alguma das especies de *Elsinoë* parasitas de Rutaceas nativas, se tivesse adaptado aos membros estrangeiros da familia, introduzidos. Com essa ideia em mente, os autores têm procurado saber si especies de *Elsinoë* ou *Sphaceloma* ocorrem na America do Sul em Rutaceas indígenas e si estas especies são patogénicas para os Citrus. Até o presente, foram constatados, do genero *Sphaceloma*, na Argentina e no Brasil, tres representantes sobre *Fagara* spp. (22) e sobre *Essenbeckia Riedeliana* ENGL. que aqui assinalamos pela primeira vez. As inoculações de um *Sphaceloma* de *Fagara coco* (GILL.) ENGL., proveniente de Tucumán, Argentina, em laranja doce, deram entretanto resultados negativos ([11]).

---

([11]) Dados ineditos.

## ANTRACNOSE DA VIDEIRA
## causada por *Elsinoë ampelina* (De By.) Shear

Estampa 9.

Conforme relata Puttemans (78) o zoologista Goeldi foi comissionado em 1888 para estudar as pragas e doenças das videiras *(Vitis* spp.) em S. Paulo. Em seu relatorio (41, p. 73) ele assinalou a ocorrencia da antracnose nos seguintes termos: «A anthracnose se observa quasi em toda a parte, mais ou menos apparente. Esta molestia persegue regularmente as variedades *V. vinifera,* não poupando tambem algumas variedades de cepas norte-americanas. Chega mesmo a atacar algumas do grupo Aestivalis. Vi um ou outro pé da Jacquez e da Herbemont atacado pelo cryptogamo causador da anthracnose». E' esta, ao que se saiba, a primeira vez que a doença foi assinalada no Brasil.

Em 1898, a antracnose da videira foi mencionada por Campos da Paz (27) no seu manual prático de viticultura brasileira. Em 1899, Campos Novaes (28) fez uma exposição do estado dos conhecimentos relativos aos fungos que causam as doenças da videira em São Paulo, acompanhando-a de um estudo de tais doenças. Na citada publicação, explica que começou a interessar-se por esses estudos depois de uma exposição vitícola que se realizara no ano anterior em S. Paulo. O trabalho de Campos Novaes é seguido, no mesmo boletim do Instituto Agronomico de Campinas, de outro sobre o mesmo assunto, de autoria de F. Noack (73), que o fez acompanhar de boas ilustrações em côres, de sua propria autoria. E' aparentemente a essas duas publicações, que juntas ocupam um fasciculo inteiro do citado boletim, de 61 paginas, que Puttemans quer referir-se quando diz (78) que, a Campos Novaes «...Noack ajudou na publicação de excellente monographia em vernaculo sobre as molestias da videira, illustrada com primorosas gravuras coloridas».

Noack reproduziu substancialmente o mesmo trabalho em alemão, num artigo de Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (74) onde parte das mesmas ilustrações é reproduzida e que foi traduzido para o português por Campos Novaes (75). O seu desenho de um acérvulo de *Elsinoë ampelina* foi reproduzido em outra publicação dos presentes autores (57). Este fungo foi recentemente isolado em S. Paulo por Gonçalves, que nos comunicou uma fotografia de sua cultura. A antracnose continuou a ocupar a atenção dos fitopatologistas no Brasil, conforme se vê em publicações mais ou menos recentes (12, 42, 77). As figuras da estampa 9 são tiradas de um trabalho recente de Gonçalves (42).

No Brasil, além de São Paulo, a antracnose da videira é conhecida em Minas Gerais (69) Rio Grande do Sul (43), Espirito Santo, Estado do Rio de Janeiro e Paraná ([12]).

A antracnose da videira existe ha muitos anos no Paraguay, Argentina e Uruguay, conforme se depreende da literatura. De acordo com HAUMAN (44) a doença foi descoberta no Paraguay em 1881 por SPEGAZZINI (84) que mais tarde (1901-1909), observou (86) que a antracnose era comum em La Plata, Argentina. Nesse país, artigos sobre a doença e seu tratamento foram publicados por HUERGO (46,47) e por HUERGO e RICARDO (48), entre 1896 e 1904. O artigo de HUERGO, datado de 1896, é a primeira publicação da nova Sección de Fitopatologia da Dirección de Agricultura y Gañaderia, Ministerio de Agricultura, então recentemente criada. No referido trabalho, os sintomas da doença são cuidadosamente descritos e ilustrados com uma litografia de uma pintura do autor. Um notavel surto da doença em La Rioja em 1902 foi assinalado por RAÑA (80) e mais ou menos na mesma época mencionou-a tambem GIROLA (39). Em 1904 LOEFGREN (63), de S. Paulo, visitou a primeira exposição argentina de frutas em Buenos Aires e fez observações sobre a fruticultura desse país. Verificou então que a antracnose da videira era abundante «tanto em Buenos Aires como na região megapotamica». Afirma igualmente que de todas as fruteiras cultivadas na Argentina a videira é a mais antiga, sendo conhecida desde 1625 e provavelmente cultivada anteriormente para fabricação do vinho utilisado nas igrejas e conventos que naquela época já eram bem numerosos. Referencias mais recentes à antracnose da videira foram feitas em 1909 (40), 1917 (26), 1920 (45) e 1924 (2). No Uruguay, em 1919, a antracnose da videira foi mencionada por GIACCONE (38), por NATTINO (72) e mais recentemente por RAMON Y ACOSTA (79).

No Chile, como nos outros países sul-americanos acima mencionados, a antracnose da videira foi uma das primeiras doenças das plantas a serem identificadas. LAVERGNE, que organisou a «Estación de Patologia Vegetal de Chile» mais ou menos em 1900, apresentou em Dezembro desse ano um relatorio (61) sobre a antracnose da videira. Naquela época a doença tinha invadido sómente algumas das regiões vitícolas do Chile, tendo-se cogitado de proíbir o transporte de estacas de videiras das regiões infetadas para as sãs (62).

---

([12]) Dados comunicados ao autor por J. DESLANDES ou constantes dos arquivos da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico.

VERRUGOSE DA AMENDOEIRA DA PRAIA
causada por *Sphaceloma terminaliae* BITANCOURT
Estampa 10.

Esta doença da amendoeira da praia ou «chapeu de sol» *(Terminalia catappa* L.) foi assinalada pela primeira vez em São Paulo em 1936 (57) e o seu agente causador foi posteriormente descrito (17). A doença foi observada por V. SILVEIRA em arvores de ornamentação das ruas de Ipanema, no Rio de Janeiro, onde o segundo autor recentemente colheu especimens.

ANTRACNOSE DE ARBUTUS
causada por
*Sphaceloma mattirolianum* (SACC. e D. SACC.) JENKINS
Estampa 4, B.

A antracnose de *Arbutus unedo* L. foi descoberta na Argentina em Abril de 1931 por GRODSINSKY e a ilustração aqui representada (Est. 4, B) foi feita com especimens por ele colhidos em Maio de 1934. A doença não é conhecida nos outros países da America do Sul.

ANTRACNOSE DE GENIPAPO
causada por *Sphaceloma genipae* BITANCOURT
Estampa 11.

Esta doença do genipapo *(Genipa americana* L.) foi assinalada pela primeira vez em 1936 em São Paulo (57) e o agente foi descrito posteriormente (17).

Recentemente, DESLANDES enviou ao segundo autor especimens de uma verrugose do genipapo, doença de caracteres diferentes da antracnose causada por *Sphaceloma genipae,* colhidos no Rio Grande do Norte em Setembro de 1938 e na Paraíba em Dezembro do mesmo ano.

ANTRACNOSE DO PECAN
causada por *Elsinoë randii* JENKINS e BITANCOURT
Estampa 5, B.

Embora um especimen do agente da antracnose do pecan *(Hicoria pecan* (MARSHALL) BRITTON), tenha sido colhido por COSTA, em Campinas, São Paulo, Brasil, em Julho de 1935, a doença sómente foi identificada quasi dois anos mais tarde (58), quando COSTA e SALLES colheram especimens que apresentavam a forma ascógena. O fungo patógeno foi então isolado. Alguns anos antes de 1935, o primeiro autor do presente trabalho tinha notado que as excelentes ilustrações de culturas do fungo isolado do pecan nos Estados Unidos,

publicadas por RAND (81), apresentavam o aspéto típico das culturas de *Elsinoë* e *Sphaceloma*. A certeza desse fato foi recentemente comprovada por uma subcultura de um isolamento feito por RAND, recebida do *Centralbureau voor Schimmelcultures*, de Baarn, na Holanda. A falta de uma tal verificação impedio a inclusão desta antracnose na lista mundial de doenças causadas por *Elsinoë* e *Sphaceloma* em 1936 (57).

## SINOPSE CRONOLÓGICA DAS DOENÇAS CAUSADAS POR "ELSINOË" E "SPHACELOMA" CONHECIDAS NA AMERICA DO SUL ATÉ JANEIRO DE 1936

A tabela (Tab. 1) mostra que a antracnose do choupo, a antracnose da videira e a verrugose da laranja doce foram encontradas pela primeira vez na America do Sul em 1880, 1881 e 1882, respectivamente, as duas primeiras por SPEGAZZINI e a última por BALANSA. Como aluno que era de SACCARDO, antes de partir da Italia, SPEGAZZINI com toda a certeza já estava familiarisado com as duas antracnoses, cujos agentes menciona sob os nomes dados por SACCARDO, *Hadrotrichum? populi* e *Gloeosporium ampelophagum*. A sua menção de *Hadrotrichum? populi* no Chile em 1909 (85, p. 696) parece ter sido a ultima em que se assinalou o fungo antes deste ter sido reconhecido como pertencente ao genero *Sphaceloma*. De outro lado, a antracnose da videira apresentava tamanha importancia para a viticultura, que ocupou a atenção dos estudiosos de S. Paulo, no Brasil, e na Argentina, antes mesmo que fossem criados laboratorios fitopatológicos nesses países. Na Argentina (1899) e no Chile (1901) artigos que tratam exclusivamente dessa doença figuram entre as primeiras publicações que vieram à luz sobre patologia vegetal, ao passo que em S. Paulo a doença, descoberta por GOELDI em 1888, foi especialmente investigada por NOACK durante a sua curta passagem (1896-1898) pelo Instituto Agronómico de Campinas, onde ocupou o que foi praticamente o primeiro cargo de fitopatologista no Brasil. A doença parece que já tinha ampla distribuição nessas épocas, no Brasil e na Argentina, mas no Chile, conforme já foi notado, a antracnose ainda se achava localisada, em 1900, em áreas relativamente restritas.

A descoberta por BALANSA em 1882, do que hoje se sabe ser a verrugose da laranja doce, permaneceu praticamente desconhecida por meio seculo, quando um pequenino especimen (53, fig. 1, A e B, reproduzida na est. 8, A e em 21, est. 6, H, forma conidiana) por ele colhido, foi oportunamente encontrado (49) e finalmente identificado (53, p. 544) como uma doença dos Citrus nova para a ciencia. A verrugose da laranja doce, foi mais tarde objéto de estudos especiais

TABELA 1

Sinópse cronológica das doenças causadas por *Elsinoë* e *Sphaceloma* conhecidas na America do Sul até Janeiro de 1936

| Doença | Patógeno | Primeiro colector na America do Sul | País | Ano | Bibliografia | Continente da primeira descrição original | | | Distribuição na Amer. do Norte e na Europa | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Amer. Sul | Amer. Norte | Europa | Amer. Norte | Europa |
| Antracnose do choupo | *S. populi* | Spegazzini | Argentina | 1880 | (83) | | | x | | x |
| Antracnose da videira | *E. ampelina* | *do* | Paraguay | 1881 | (84) | | | x | x | x |
| Verrugose da laranja doce | *E. australis* | Balansa | *do* | 1882 | (21,53,59) | x | | | | |
| Verrugose de Iresine | *E. amazonica* | Ule | Perú | 1911 | (88) | x | | | x | |
| Verrugose de Calopogonium | *E. calopogonii* | Ule | *do* | *do* | *do* | x | | | | |
| Verrugose da laranjeira azeda | *E. fawcetti* | Averna Saccá | Brasil | 1913? | (10) | | x [a] | | x | |
| Antracnose da roseira | *S. rosarum* | Marchionatto | Argentina | 1923<br>1924 | (65) | | | x | x | x |
| Antracnose da pereira e macieira | *E. piri* | *do* | *do* | *do* | *do* | | | x | x | x |
| Verrugose do abacateiro | *S. perseae* | Abbott<br>Gonçalves | Perú<br>Brasil | 1929 [b]<br>1931 | (8)<br>(57) | | x [c] | | | |
| Antracnose de Arbutus | *S. mattirolianum* | Grodsinsky | *do* | 1931 [d] | *do* | | | x | | x |
| Antracnose de Rubus | *E. veneta* | Marchionatto | Argentina | 1932 | *do* | | | x | x | x |
| Verrugose da amendoeira da praia | *S. terminaliae* | Lepage | Brasil | *do* | *do* | x | | | | |
| Antracnose do genipapo | *S. genipae* | Ract | *do* | 1935 | *do* | x | | | | |

a As primeiras indicações da doença no mundo são do Japão, conforme já foi citado (49).
b Vêr explicação p. 34.
c As primeiras indicações da doença na America do Norte datam de 1915 e 1916 na Florida e 1916 em Cuba (56).
d Especimen comunicado por Grodsinsky, Monasterio, Prov. de B. A., Argentina, Herbario min. agr. Lab. de Botanica, 45.838, Maio, 1931.

(19,21,23). Valiosos dados referentes à distribuição da verrugose da laranja doce na America do Sul foram recentemente obtidos, conforme foi relatado no paragrafo correspondente do presente trabalho. Pelas informações de que hoje dispomos sobre essa doença, verifica-se que atualmente, nas regiões citrícolas onde ocorre, a verrugose da laranja doce figura entre as doenças de maior importancia economica.

Um exame da tabela, em conjunto, revela que as primeiras menções relativas às 13 doenças citadas são de 4 países sul-americanos: Argentina, Brasil, Paraguay e Perú. Oito delas foram descritas em primeiro lugar em outros países e podem ser consideradas, na America do Sul, como de origem estrangeira. Entre essas, 6 foram descritas em primeiro lugar na Europa e 2 nos Estados Unidos. As 5 doenças restantes foram descritas na America do Sul e, com exceção da verrugose de Iresine, conhecida igualmente de Porto Rico (1886), não são conhecidas em outros continentes. Tres das doenças descritas em primeiro lugar na Europa, ainda não foram assinaladas na America do Norte, as antracnoses do choupo, da macieira e pereira, e de *Arbutus*.

## ILLUSTRATIONS OF SOUTH AMERICAN "ELSINOË" AND "SPHACELOMA" DISEASES KNOWN UP TO JANUARY, 1936.


### *Abstract*

*Illustrations are shown of the 13 diseases caused by Elsinoë and Sphaceloma known in South America up to January 1936. Additional data concerning the history and distribution of these diseases are also given. The paper supplements the article «Doenças das plantas causadas por fungos dos generos Elsinoë e Sphaceloma» published in 1937 (57).*

*The distribution of poplar anthracnose in Chile is shown through* SPEGAZZINI's *discovery there of Hadrotrichum? populi, now known as Sphaceloma populi.*

*The occurrence of scab of Iresine in North America (Puerto Rico) before it was discovered in Peru is recorded.*

*Mention is made of the rapid spread of avocado scab in São Paulo, Brazil, and its prevalence in a certain locality in Minas Gerais, Brazil, since its introduction in Brazil 10 years ago.*

*Of the related diseases, anthracnose of each apple and pear, Rubus, and rose, the first two are still known only in Argentina, but a recent record of rose anthracnose in Venezuela is given.*

*Scab of Calopogonium, heretofore represented only by the type specimen from Peru, is recorded on a phanerogamic herbarium specimen from other than the type locality in that country.*

*Additional data on the history of sour orange scab and sweet orange fruit scab are given, and the present distribution of the two diseases and the kinds of citrus they affect in South America are reviewed.*

*A survey of the early history of grape anthracnose in South America reveals that in Brazil, Argentina, Paraguay, and Chile, if not in Uruguay, this disease commanded the attention of viticulturists as early as 1881-1900, which in some cases was before phytopathological laboratories were created in those countries.*

*Of the three remaining Elsinoë and Sphaceloma diseases known in South America up to January, 1936, scab of beach almond (Terminalia catappa) is reported from a new locality, viz., Rio de Janeiro. No new records of anthracnose of Arbutus unedo (known only in Argentina) are given, but anthracnose of Genipa americana or a similar disease with somewhat different symptoms, is reported from Rio Grande do Norte, Brazil.*

*It is shown that specimens of anthracnose of pecan had actually been collected in Brazil (São Paulo) in July, 1935, although the disease was not diagnosed until after January, 1936.*

*Chronologically the 14 Elsinoë and Sphaceloma diseases referred to in the paper were first found in South America between the years 1880 and 1935. Among these diseases poplar anthracnose was found in Argentina in 1880 and grape anthracnose in Paraguay in 1881 by* SPEGAZZINI, *while what is now known to be sweet orange fruit scab was discovered in Paraguay in 1882, by* BALANSA. *Five additional members of the group including sour orange scab were found in South America between 1911 and 1923-24, and the remaining 6 diseases of which 2 were new to science, from 1929 to 1935. Among the 14 diseases, 5 were first described from South America, 3 from North America, and 6 from Europa. With the exception of scab of Iresine, of which a Puerto Rican record of 1886 is herein reported, the 5 diseases of the first group are not known outside of South America.*

*The quarantine measures that have been established as these diseases have become known are indicative of the recognition of their economic importance and the need for restricting their spread.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — ANÓNIMO — 1921 — Decreto n.º 15.198 — De 21 de Dezembro de 1921. Aprova o regulamento de Defeza Sanitaria Vegetal. *Diario Oficial* (Rio de Janeiro) Dez. 1921.

2 — ANÓNIMO — 1924 — Anthracnosis de la vid (Gloeosporium ampelophagum (DE BARY). *Min. Agr. de la Nación, Seción Propaganda y informes. Defensa Agricola. Policia de los Vegetales.* 4 p. Circ. 201.

3 — Anónimo — 1929 — Synthese das inspecções de vigilancia sanitaria vegetal pelo Municipio de Pelotas, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro. Typog. do *Serv. de Inform. Minist. Agric.* 18 pp.

4 — Anónimo — 1936 — Legislative and administrative measures. Australia (Commonwealth of). *Internatl. Inst. Agr. Bull. Plant Protect.* **10**: 131M.

5 — Anónimo — 1936 — Circular aos viveiristas sobre a verrugose do abacateiro. *O Biologico* (S. Paulo) **2** : 180.

6 — Anónimo — 1937 — Ministerio da Agricultura, Brasil, 1937. Portaria n.º 4. 4.896-A, de 17 de Outubro. *Diario Oficial* (Rio de Janeiro) Numero de 26 de Outubro, 1937.

7 — Anónimo — 1938 — Legislative and administrative measures. Brazil. *Internatl. Inst. Agr. Bull. Plant Protect.* **12**:31M.

8*— Abbott, E. V. — 1929 — Diseases of economic plants in Perú. *Phytopathology.* **19**:645-656.

9 — Araujo Marques, Mario de — 1938 — A verrugose do abacateiro. *Minis. Agr. Serv. Def. San. Veg.,* Rio de Janeiro. Publ. n.º 13. 27 pp.

10 — Averna Saccá, Rosario — 1917 — Molestias cryptogamicas da laranjeira e do limoeiro. *Bol. Agr. Secr. Agric. Ind. Obras Publ.,* São Paulo. **18**:**1**:49-86.

11 — Bertoni, A. de W. — 1927 — Los principales enemigos de la Agricultura y su desarrollo em 1925-26. Anexo n.º 8, *Mem. Dir. Agr. Paraguay,* 1925-26:94-113.

12*— Bitancourt, A. A. — 1930 — Doenças cryptogamicas das plantas cultivadas. *Agronomia* (Rio de Janeiro). **1**:239-253.

13*— Bitancourt, A. A. — 1934 — As manchas das laranjas. *Inst. Biol. Def. Agr. e Anim.,* São Paulo. Folheto 53. 35 pp.

14 — Bitancourt, A. A. — 1936 — A verrugose do abacateiro. *O Biologico.* (São Paulo) **2**:157-160.

15 — Bitancourt, A. A. — 1936 — Doenças do abacateiro. *O Biologico.* (São Paulo) **2**:386.

16 — Bitancourt, A. A. — 1937 — Relação das doenças e fungos parasitas observados na Secção de Phytopatologia durante os annos de 1395 e 1936. *Arch. Inst. Biol.,* São Paulo. **8**:315-322.

17 — Bitancourt, A. A. — 1938 — Novas especies de Sphaceloma sobre Terminalia e Genipa. *Arch. Inst. Biol.,* S. Paulo **8**:197-200.

18*— Bitancourt, A. A., Fonseca, J. P. e Autuori, M. — 1933 — *Manual de Citricultura,* II. Parte. Doenças, Pragas e Tratamentos. 212 pp.

19 — Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1936 — Variações de Elsinoe australis Bitancourt e Jenkins. (Abstracto) *Rodriguésia.* **2**: numero especial (Annaes da Primeira reunião de Phytopathologistas do Brasil) :315-317, 1936 (1937).

20*— Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1936 — Elsinoe fawcetti the perfect stage of the citrus scab fungus. *Phytopathology.* **26**:393-396.

21*— Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1937 — Sweet orange fruit scab caused by Elsinoe australis. *Journ. Agr. Res.,* **54**:1-18.

22 — Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1938 — New species, hosts and distribution records of Elsinoe and Sphaceloma. *Chronica Botanica,* **4**:388-389.

* Vêr nota 2, p. 32.

23 — BITANCOURT, A. A. & JENKINS, A. E. — 1939 — Ciclo evolutivo de Elsinoe australis BITANCOURT e JENKINS, agente da verrugose da laranja doce. *Arch. Inst. Biol.*, S. Paulo. **10**:

24 — BLANCHARD, E. E. — 1930 — Principales insectos y enfermedades que perjudican los cultivos citricos en la República Argentina. *Min. Agric., Sec. Prog. y Informes.* Cir. n.º 815. 114 pp.

25* — BONDAR, G. — 1929 — Insectos damninhos e molestias da laranjeira no Brasil. *Lab. Path. Veg. Bahia.* Bol. 7, 79 p.

26 — BOVET, P. A. — 1917 — Enfermedades más comunes de los Frutales y manera de combatirlas en 81 ilustraciones y un calendario de pulverizaciones. Folleto n.º 1. *Chacra Exp. de Patagones* (Prov. Buenos Aires) 104 p.

27 — CAMPOS DA PAZ, A. F. — 1898 — Anthracnose. *Manual pratico do viticultor brasileiro.* Com um prefacio do Dr. Luiz Pereira Barreto. Rio de Janeiro. p. 417-418.

28 — CAMPOS NOVAES, J. — 1899 — Cryptogamos microscopicos das videiras. *Bol. Inst. Agron. em Campinas.* Est. de S. Paulo. **10**:51-90.

29* — CARVALHO, R. S. — 1932 — Contribuição ao estudo das causas de algumas podridões dos frutos citricos no Estado de São Paulo, 22 pp.

30 — ENGLER, A. & PRANTL, K. — 1897 — Die Natürlichen Pflanzenfamilien.

31* — FAWCETT, G. L. — 1920 — La verruga o «scab» de los citrus. *Rev. Indus. y Agr. Tucuman,* **10**:24-128.

32* — FAWCETT, G. L. — 1931 — La verrucosis de los «citrus». *Rev. Indus. y Agr. Tucuman,* **10**:124-128.

33 — FAWCETT, H. S., GRILLO, H. S. V., BITANCOURT, A. A. & MÜLLER, A. S. — — Relatorio sobre as doenças dos Citrus no Distrito Federal, Estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais. *Rodriguésia* (Rio de Janeiro), **2**:329-344.

34 — FAWCETT, H. S. & BITANCOURT, A. A. — 1937 — Relatorio sobre as doenças dos Citrus nos Estados de Pernambuco, Bahia, São Paulo e Rio Grande do Sul. *Rodriguésia* (Rio de Janeiro), **3**:213-236.

35 — FAWCETT, H. S. & BITANCOURT, A. A. — 1939 ? — Observações sobre as doenças dos Citrus na America do Sul (em preparação).

36 — FERREIRA LIMA, A. D. — 1937 — Uma doença grave no abacateiro. *Rev. Agron.* Rio Grande do Sul, **1**:486-489.

37 — FRESA, R. — 1936 — Argentine Republic: Melampsora larici-populina in the Delta of Paraná. *Inst. Agr. Bull. Plant Protect.*, **10**:145-146.

38 — GIACCONE, V. — 1919 — Los principales enemigos del viñedo. *Bol. Men. Defensa Agr. Uruguay,* **2**:67-70.

39 — GIROLA, C. D. — 1902 — Enfermedades de la vid. Memoria correspondiente al año comprendido entre Abril 30, de 1900 y Abril 30, de 1901. *Bol. Agr. y Ganad. Min. Agr. Rep. Argentina.* Buenos Aires, **31**:376-377.

40 — GIROLA, C. D. — 1909 — Enfermedades de las plantas estudiadas en la Republica Argentina, livro A, p. 365-396.

41 — GOELDI, E. A. — 1889 — Relatorio provisorio sobre a commissão relativa ás molestias da parreira na provincia de S. Paulo, principalmente quanto á questão phylloxerica. Rio de Janeiro. *Imp. Inst. Flum. Rev. Agr.*, **20**:59-75.

42 — Gonçalves, R. D. — 1938 — Principaes doenças da videira em São Paulo. *O Biologico* (São Paulo), **4**:8-10, 25-29, 76-82; 115-121; 145-152; 196-200.

43 — Gobbato, Celeste, — 1931 — Manual do Viti-Vinicultor Brasileiro. 3.ª edição 446 pp.

44*— Hauman, L. — 1915 — Les parasites végétaux des plantes cultivées en Argentine et dans les régions limitrophes. *Anal. Mus. Nac. Hist. Nat.* Buenos Aires, **26**:201.

45*— Hauman, L. & Parodi, L. R. — 1920-1921 — Los parasitos vegetales de las plantas cultivadas en la Rep. Argentina. *Rev. Fac. Agron. y Vet.*, **3**:257.

46 — Huergo, J. M. — 1899 — Antracnosis de la vid. Argentina. *Min. Agr. Dir. Agr. y Ganad.*, Sec. Fitopat. (Folheto 1) 28 pp.

47 — Huergo, J. M. — 1904 — Enfermedades de algunas plantas cultivadas en el Paraná. *Bol. Min. Agr.* Buenos Aires, **2**:236-240.

48 — Huergo, J. M. & Ricardo, J. — 1896 — Enfermedades de vid. La antracnosis (Sphaceloma ampelinum). *Bol. Nac. Agr. Argentina*, **20**:97-104, 148-157, 193-202.

49*— Jenkins, A. E. — 1931 — Development of the citrus scab organism Sphaceloma fawcetti. *Journ. Agr. Res.*, **42**:545-558.

50*— Jenkins, A. E. — 1932 — Elsinoe on apple and pear. *Journ. Agr. Res.*, **44**:689-700.

51*— Jenkins, A. E. — 1932 — Rose anthracnose caused by Sphaceloma. *Journ. Agr. Res.*, **45**:321-337.

52*— Jenkins, A. E. — 1933 — Additional studies of species of Elsinoe and Sphaceloma. *Mycologia*, **25**:213-220.

53*— Jenkins, A. E. — 1933 — A Sphaceloma attacking navel orange from Brazil. *Phytopathology*, **23**:538-545.

54*— Jenkins, A. E. — 1934 — Sphaceloma perseae the cause of avocado scab. *Journ. Agr.*, **49**:859-869.

55 — Jenkins, A. E. — 1938 — Elsinoe on lemon fruits from Paraguay. *Phytopathology*, **28**:73-75.

56 — Jenkins, A. E. — 1939 — Avocado scab shown in early photographs *Calavo News*, **13**:2.

57 — Jenkins, A. E. & Bitancourt, A. A. — 1936 — Doenças das plantas causadas por fungos dos generos Elsinoe e Sphaceloma. *Rodriguésia*, numero especial (Annaes da Primeira Reunião de Phytopathologistas) **2**:305-313. 1936 (1937).

58 — Jenkins, A. E. & Bitancourt, A. A. — 1938 — An Elsinoe on Hicoria pecan. *Phytopathology*, **28**:75-78.

59*— Jenkins, A. E. & Fawcett, H. S. — 1933 — Records of citrus scab mainly from herbarium specimens of the genus Citrus in England and the United States. *Phytopathology*, **23**:475-482.

60 — Jenkins, A. E. & Massey, L. M. — 1938 — Rose anthracnose. *Amer. Rose. Annual* 1938:136-141.

61 — Lavergne, G. — 1900 — Observaciones sobre algunas enfermedades de la vid em 1899-1900. Estracto del *Bol. Soc. Nac. de Viticultores* y de las *Publicaciones de la Est. de Patologia Vegetal.* Santiago de Chile. 14 pp.

62 — LAVERGNE, G. — 1901 — La anthracnose de la vid. (Gloeosporium ampelophagum) Historia y medios de defensa. *Pub. Est. Pat. Veg. de Chile,* n.º 8, 8 pp.

63 — LOEFGREN, A. — 1904 — A fructicultura em Argentina. Observações feitas numa excursão a Buenos Aires em commissão do governo de São Paulo. *Sec. Agr. Com. e Obr. Publ. Estado de S. Paulo.* 43 pp.

64 — MAGARINOS TORRES, ANTONIO FRANCISCO — 1925 — Defesa Sanitaria Vegetal. *Min. Agr. Ind. Commer. Inst. Biol. Def. Agric.,* Rio de Janeiro. Bol. 5, 81 pp.

65*— MARCHIONATTO, J. B. — 1924 — Nueva contribución al conocimiento de los hongos parasitos de las plantas cultivadas. *Rev. Facult. Agron.,* La Plata, **15** (3): 7-21.

66*— MARCHIONATTO, J. B. — 1934 — Argentine Republic: Plant diseases observed in the country. Apple anthracnose. *Internatl. Inst. Agr. Bull. Plant Protect.,* Reprint from Internat. Rev. Agr., 8:241.

67 — MARCHIONATTO, J. B. — 1939 — Notas micológicas. *Physis* (Rev. Soc. Arg. Cienc. Nat.), **15**:133-144.

68 — MÜLLER, A. S. — 1933 — Observations and notes on citrus diseases in Minas Geraes, Brazil. *Phytopathology,* **23**:734-737.

69 — MÜLLER, A. S. — 1934 — Lista preliminar de las enfermedades de las plantas cultivadas en el Estado de Minas Geraes. *Monitor Intern. Defensa Plantas,* **9**:193-198.

70 — MÜLLER, A. S. — 1935 — Brazil: preliminary list of diseases of ornamental plants in the State of Minas Geraes in 1934. *Int. Bull. Pl. Prot.,* **8**:175-176.

71 — MÜLLER, A. S. & BITANCOURT, A. A. — 1936 — As doenças dos Citrus no herbario de A. PUTTEMANS. *O Biologico* (S. Paulo), **2**:65-66.

72 — NATTINO, J. P. — 1919 — Los parasitos vegetales y animales de las plantas cultivadas y espontaneas, observadas em la Republica Oriental del Uruguay. *Bol.* **36**, 94 pp. 1919. Antracnosis p. 59-60, fig. 44-47.

73*— NOACK, F. — 1899 — Molestias das videiras. *Bol. Inst. Agron. do Estado de São Paulo* (Campinas), **16**:91-112.

74 — NOACK, F. — 1899 — Rebkrankheiten, in Brasilien beobachtet. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten,* **9**:1-10.

75 — NOACK, F. — 1900 — Molestias das videiras observadas no Brasil. *Bol. da Agr.* (São Paulo), **1**:308-317. (Tradução do trabalho anterior, por Campos Novaes).

76 — NOACK, F. — 1900 — Pilzkrankheiten der Orangenbäume in Brasilien. *Zeitschr. f. Pflanzenkrankheiten,* **10**:321-335.

77 — PICENA, A. M. P. — 1935 — Lições de viticultura do curso pratico de fructicultura e enologia de São Roque. Dep. Fomento Produc. Veget. 7.ª sec. téc. (Fruticultura e Horticultura): *Sec. Agr. Ind. e Com. Est. S. Paulo,* Brasil. 137 pp. Anthracnose 78-82.

78 — PUTTEMANS, A. — 1936 — Alguns dados para servir á historia da phytopathologia no Brasil e ás primeiras notificações de doenças de vegetaes neste país. *Rodriguésia,* numero especial (Annaes da Primeira Reunião de Phytopathologistas do Brasil), **2**:17-36. 1936 (1937).

79 — RAMÓN y ACOSTA, D. — 1931 — Gloeosporium ampelophagum Sacc. Investigaciones fitopatologicas. *Rev. Fac. Agr. Univ. Montevideo,* **4**:88.

80 — RAÑA, E. S. — 1906 — Informe sobre las enfermedades de la vid en la Rioja. Republ. Argentina. *Ministerio de Agricultura. Div. Agr.*, Buenos Aires. 23 pp.
81 — RAND, F. V. — 1914 — Nursery blight, *in* Some diseases of pecans. *Journ. Agr. Res.*, **1**:305-312.
82 — RANGEL, J. F. & GOMES, J. G. — 1938 — Guia para reconhecimento e combate das principaes doenças e pragas da laranjeira. *Publ. Serv. Defesa San. Veg. Dep. Nac. Prod. Veg.*, Brasil. n.º 11. 78 pp.
83*— SPEGAZZINI, C. — 1880 — Fungi Argentini. *An. Soc. Cient. Argentina*, **9**: (158)-192.
84 — SPEGAZZINI, C. — 1886 — Fungi Guaranitici V. *An. Soc. Cient. Argentina*, **22**:203.
85 — SPEGAZZINI, C. — 1910 — Ramillete de hongos chilenos. *Rev. Facultad. Agron. y Vet.*, **6**:183.
86 — SPEGAZZINI, C. — 1911 — Mycetes argentinenses. *An. Mus. Nac. Buenos Aires. Ser.* **3**, 13:401.
87*— SPEGAZZINI, C. — 1920 — Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de «agrios» en el Paraguay. *An. Soc. Cient. Argentina*, **90**:155-188.
88*— SYDOW, H. & SYDOW, P. — 1916 — Fungi amazonici a cl. E. Ule lecti. *Ann. Mycol.*, **14**:65-97.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 1

Verrugose ou antracnose em folhas de choupo. *A.* Sobre choupo da Lombardia, Delta do Paraná, Argentina, 6 de Maio de 1938. Col. L. GRODSINSKY. *A.* pagina superior (*a*) e inferior (*b*) da mesma folha. ×1. *B.* Pagina superior de uma folha de choupo de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. 28 de Abril de 1935. Col. R. P. AVELAR. ×5. *A.* Fotografia por M. L. F. FOUBERT; *B.* por A. A. BITANCOURT.

### Estampa 2

Verrugose de *Iresine (Iresine argentata)* (*A* e *B*) e verrugose de *Calopogonium (Calopogonium coeruleum)* (*C*), Seringal Auristella, Rio Acre, Perú, 1911. Col. E. ULE ×1. Fotografia por M. L. F. FOUBERT.

### Estampa 3

Verrugose do abacateiro. *A* e *B.* Na pagina superior (*A*) e inferior (*B*) de duas folhas diferentes de *Persea americana* MILL. do grupo antilhano, Limeira, Estado de São Paulo, Brasil. 2 de Setembro de 1932. Col. A. A. BITANCOURT. ×1. *C* e *D.* Na pagina superior (*C*) e inferior (*D*) de duas folhas diferentes de *Persea americana* de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 18 de Junho de 1934, col. A. S. MÜLLER. ×1. Fotografias por M. L. F. FOUBERT.

### Estampa 4

*A.* Antracnose da macieira e pereira sobre folhas de pereira, *Pyrus communis* L. Tigre, Argentina. 3 de Outubro de 1925, comunicado por J. MARCHIONATTO. × 1. Pagina superior das folhas. *B.* Antracnose de *Arbutus (Arbutus unedo* L.), Moreno, prov. Buenos Aires, Argentina, Abril de 1934, Col. L. GRODSINSKY. ×1. Pagina superior da folha. *C.* Antracnose da roseira, sobre

*Rosa* sp., Buenos Aires, Argentina, 7 de Fevereiro de 1935, col. A. S. MÜLLER. *D.* Antracnose da macieira e pereira sobre folha de macieira. La Plata, Argentina, 2 de Maio de 1937. FAWCETT e BITANCOURT. $\times 1$. Face superior da folha. Fotografias por M. L. F. FOUBERT.

Estampa 5

*A.* Antracnose de *Rubus* na face superior de uma folha de *Rubus ulmifolius* SCHOTT, Buenos Aires Prov. de Buenos Aires, 1932, Seg. J. MARCHIONATTO. $\times 1$. Fotografia cedida por J. MARCHIONATTO. *B.* Antracnose do pecan na face superior de uma folha de *Hicoria pecan* (MARSH.) BRITT., Campinas, Brasil, 20 de Maio de 1937. Col. COSTA e SALLES. $\times 1$. Fotografia por A. A. BITANCOURT.

Estampa 6

Verrugose da laranjeira azeda sobre laranjeira azeda (*Citrus aurantium* L.) Cantareira, São Paulo, Brasil. 29 de Fevereiro de 1936. Col. A. E. JENKINS e E. RACT. $\times 1$. Face inferior das folhas. Fotografia por M. L. F. FOUBERT.

Estampa 7

Verrugose sobre laranja doce? (vêr página 44), San Antonio, Paraguay. Outubro de 1919. Col. C. SPEGAZZINI. *A.* Envelope do especimen do herbario SPEGAZZINI, com desenhos a lapis pelo autor. $\times 1$. *B.* Conteudo do envelope. $\times 1$. *C.* Detalhe de *B*, $\times 5$. *D.* Acervulos do fungo $\times 500$. Fotografias por A. A. BITANCOURT e W. RODRIGUES.

Estampa 8

Varios especimens de verrugose da laranja doce sobre casca de fruta de laranjeira doce (*A-E*) de laranjeira azeda (*F* e *G*) e em folha de laranja seleta (*Citrus sinensis* OSB.) (*I*) das seguintes origens: *A.* Villa Rica, Paraguay, 1882. B. BALANSA. $\times 7$. *a,* $\times 1$. Segundo JENKINS e FAWCETT (59). *B* e *C.* Corrientes, Argentina. 1928, M. KISLIUK. $\times 1$. *D* e *E.* Yerbal (*D*) e Montevideo (*E*), 1928 e 1932 respectivamente, W. HERTER. $\times 1$. *F.* Corrientes, Argentina, 1934, comunic. por L. GRODSINSKY. $\times 1$. *G* e *H*, Tucumán, Argentina, 1937, G. L. FAWCETT; *H.* secção de *G*, mostrando acervulos na superficie da lesão. *G.* $\times 1$. *H,* $\times 275$. *I.* Inhoaíba, Distrito Federal, Brasil. 1936, H. S. FAWCETT e A. A. BITANCOURT. $\times 2$, Fotografias por M. L. F. FOUBERT (*A-H*) e BITANCOURT (*I*).

Estampa 9

Antracnose da videira sobre *Vitis* sp. *cultae*. Cantareira, São Paulo, Brasil. 21 de Dezembro de 1936. Col. E. RACT. *A.* Lesões em bagas. $\times 2/3$. *B.* e *C.* Sobre a face superior (*B*) e inferior (*C*) de folhas. $\times 2/3$. *D.* Lesões em hastes novas. $\times 1$. Segundo R. D. GONÇALVES (42).

Estampa 10

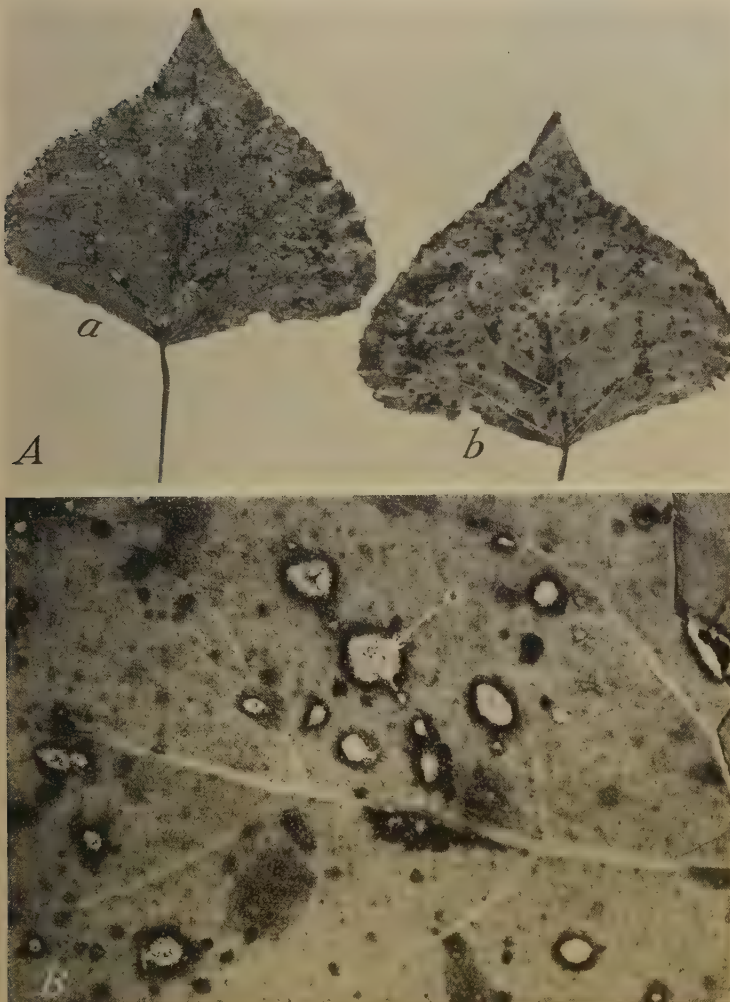
*A* e *B.* Verrugose da amendoeira da praia. Santos, São Paulo, Brasil, 21 de Outubro de 1935. H. S. LEPAGE. *A.* na face superior da folha. $\times 1/2$. *B.* Aparencia das lesões na face inferior da folha. $\times 5$. *C.* Acervulos do fungo, cobertos de microconidias. $\times 500$. *D.* Frutos afetados com a verrugose. $\times 1$. Segundo BITANCOURT (17). Uma parte de *D.* não tinha sido publicada anteriormente.

Estampa 11

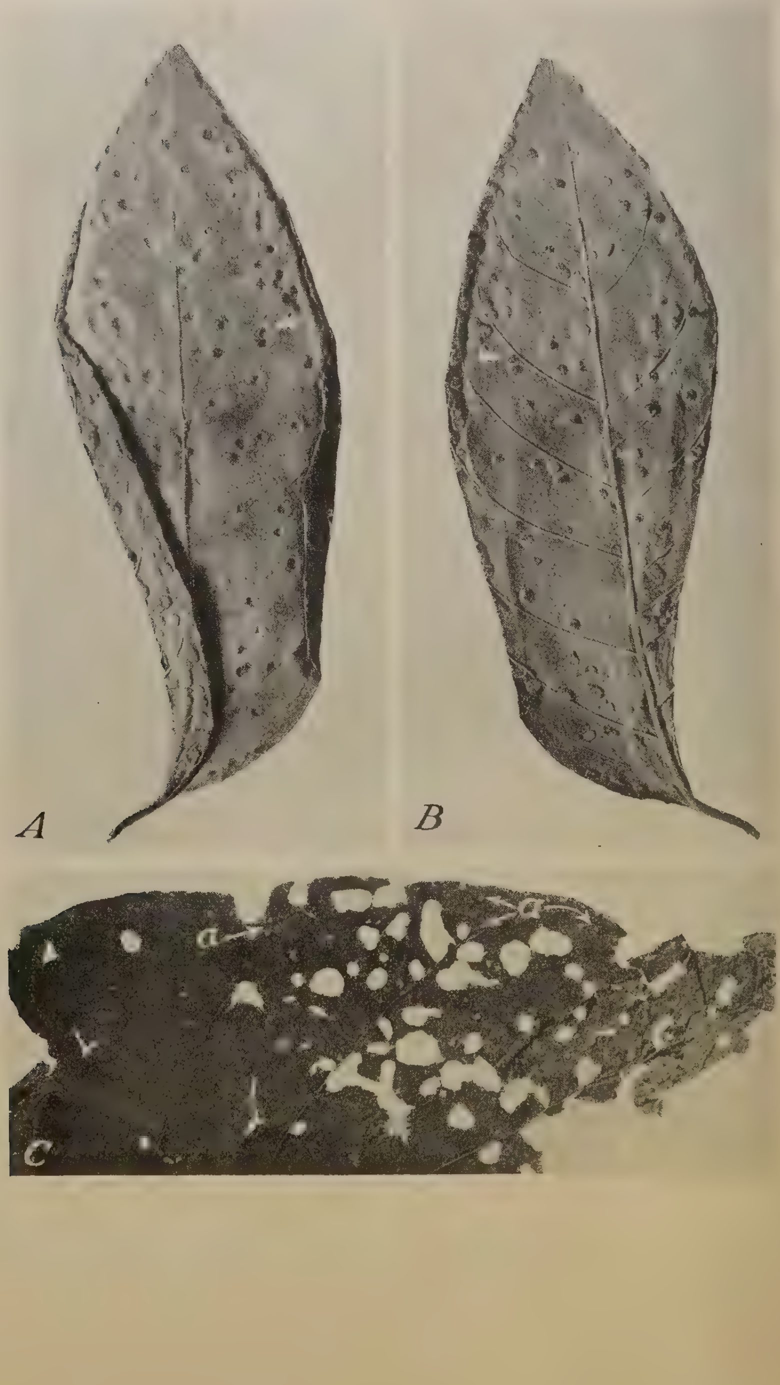
Antracnose do genipapo (*Genipa americana* L.) na face superior de folhas. Cantareira, São Paulo, Brasil, 26 de Maio de 1936, col. A. E. JENKINS e E. RACT. Pouco reduzida. Fotografia por M. L. F. FOUBERT.

———o———

Estampa 1



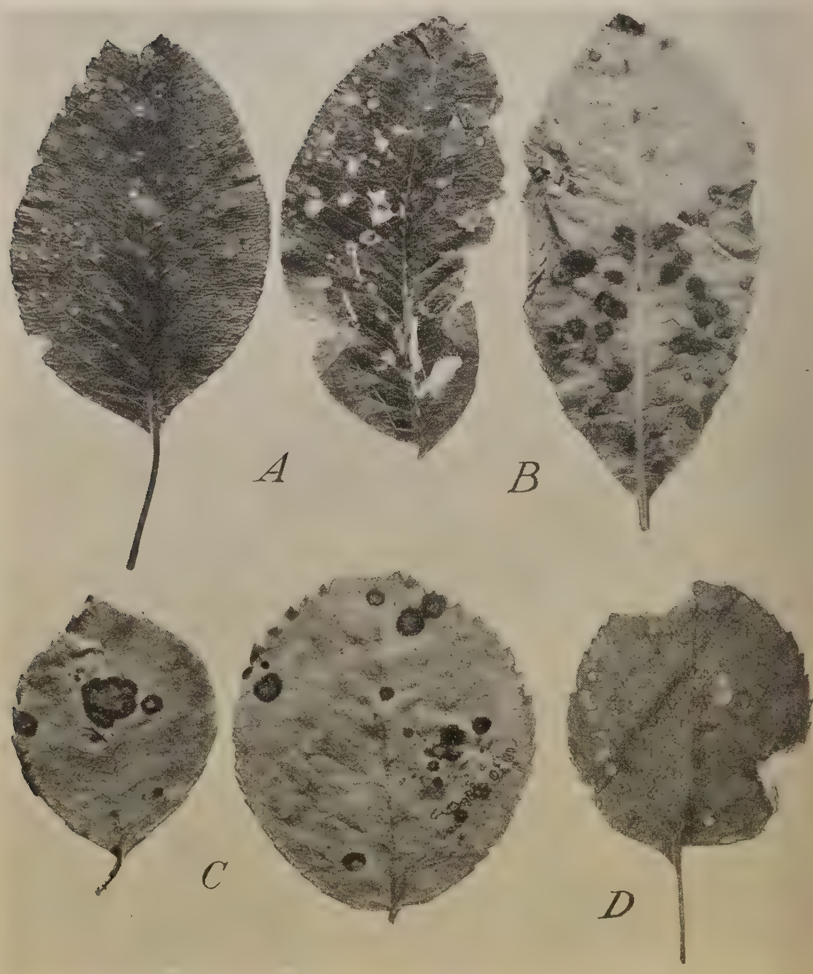
Estampa 2



Estampa 3

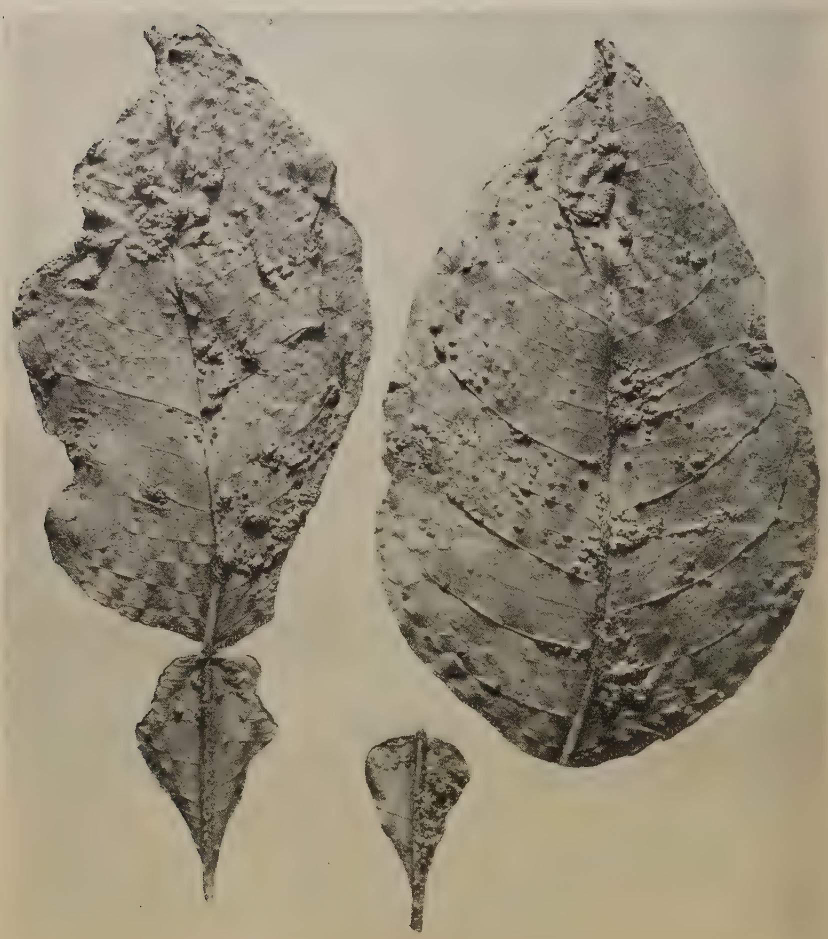


Estampa 4

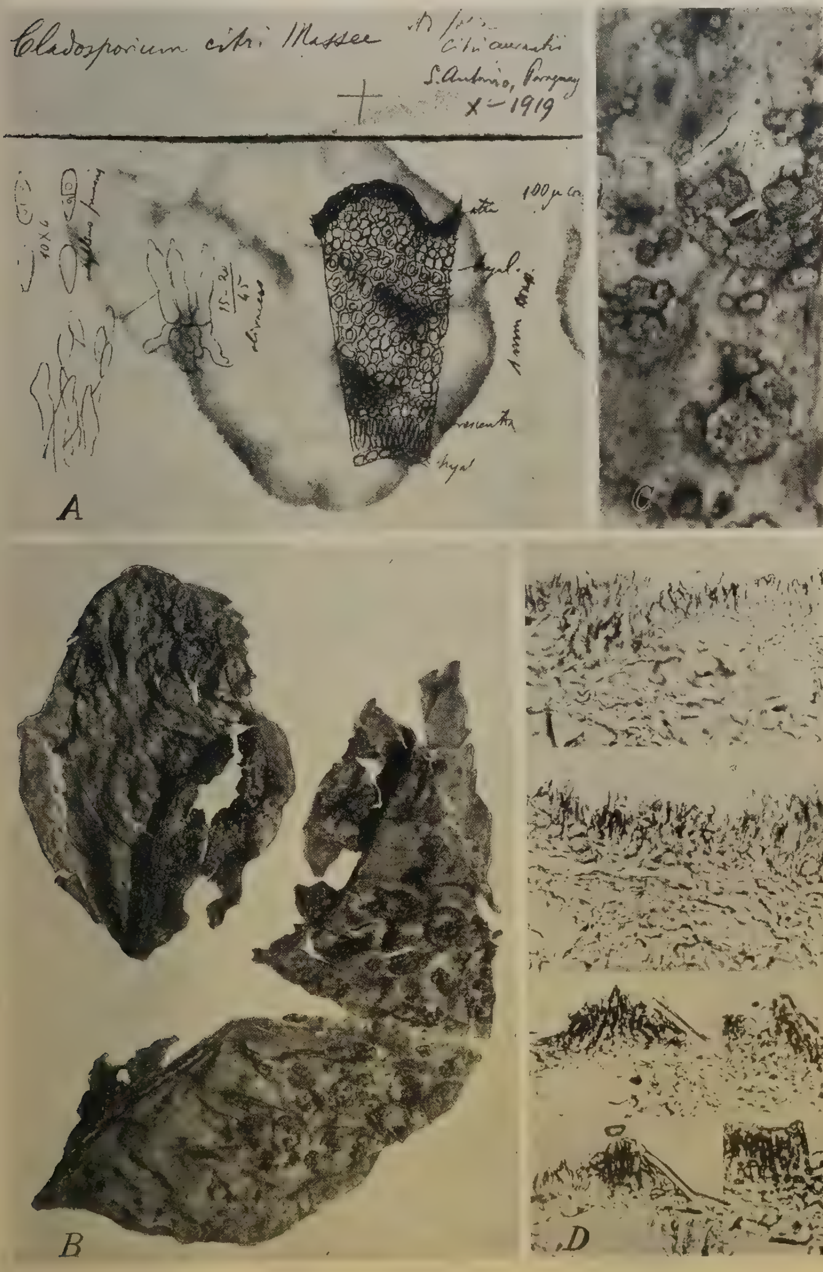


Estampa 5

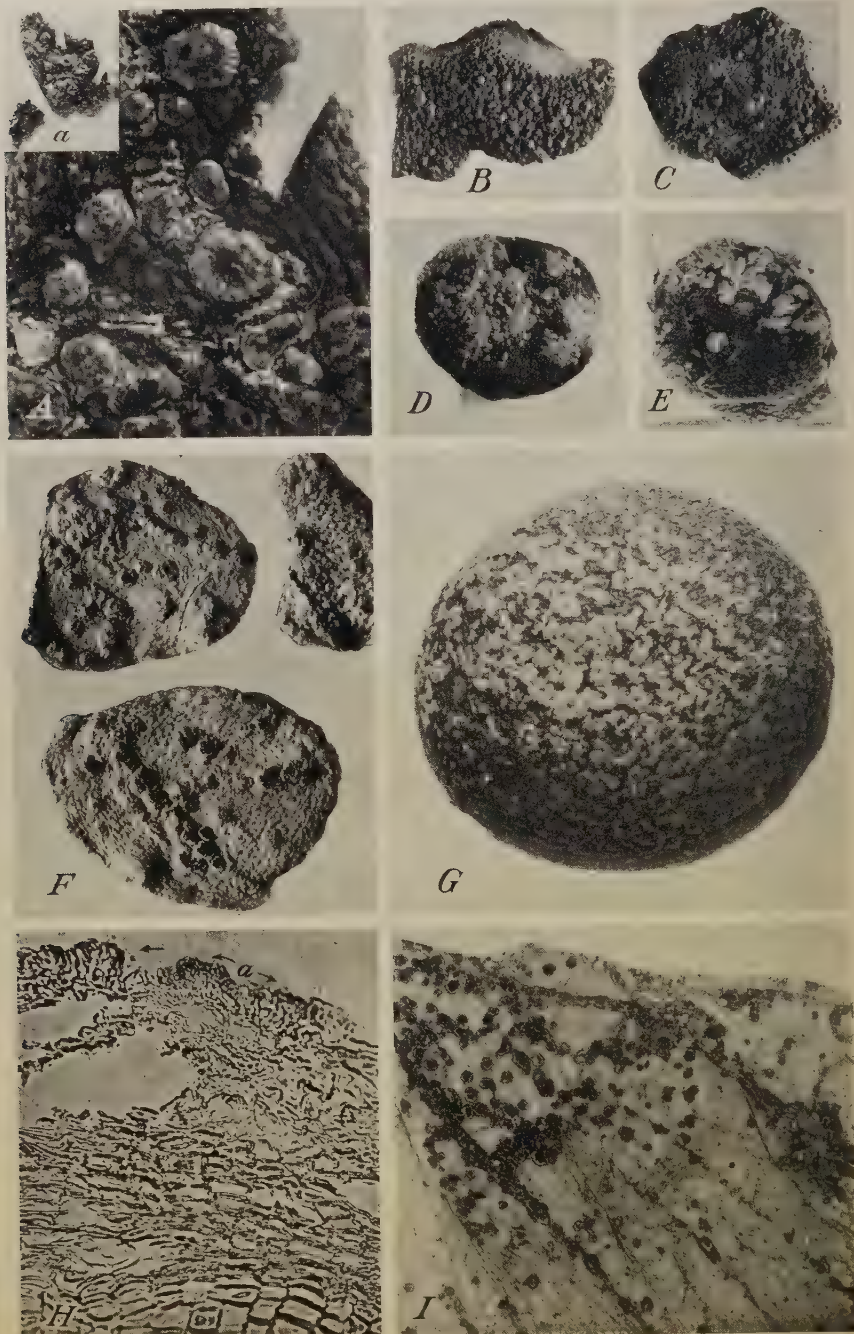


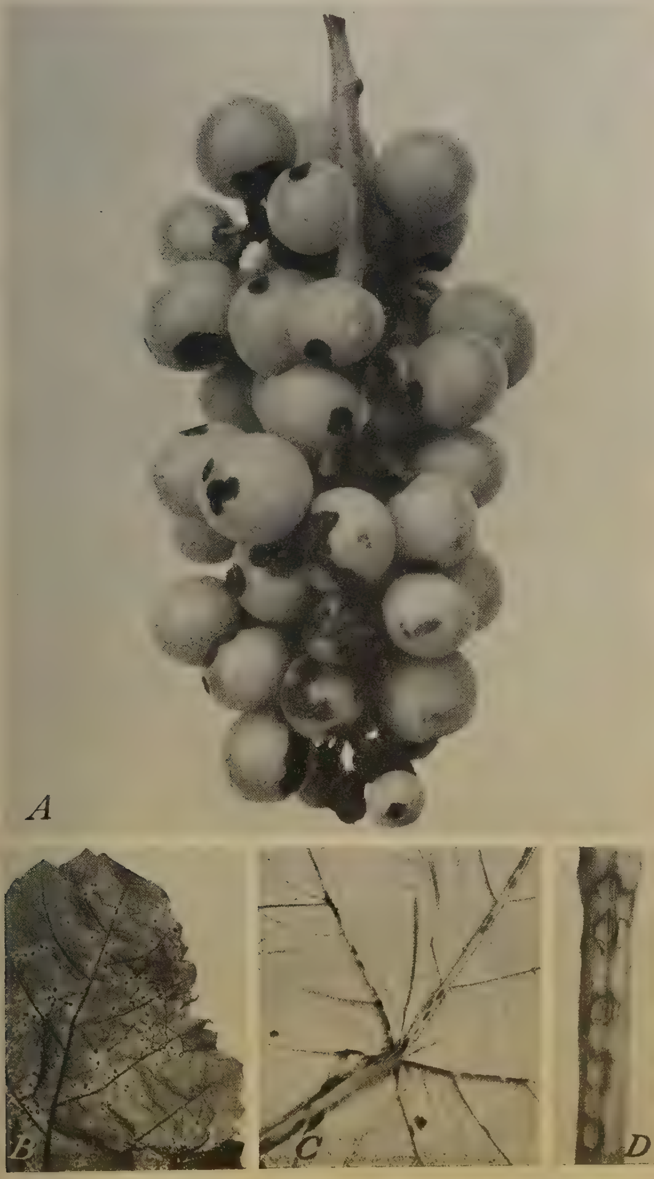


Estampa 7



Estampa 8




A
B
C
D


A
B
C
a
D

Estampa 11



# A DISSEMINAÇÃO DO MOSAICO DO FUMO NO CAMPO

POR

K. Silberschmidt e M. Kramer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto e estampa 12

Embora a doença do Mosaico do fumo tenha sido descrita ha mais de 50 anos e pesquisada intensamente de então para cá, ainda não foi bem esclarecida a questão da importancia que os diversos fócos dessa doença realmente têm, para a disseminação do mosaico no campo. Como se trata de um assunto complexo, apresentamos agora algumas observações preliminares sobre a propagação dessa doença na natureza, em um campo onde haviam sido distribuidas plantas inoculadas artificialmente.

## HISTORICO

A. MAYER (13), a quem devemos os primeiros estudos sobre a doença, em 1886, frizou que uma planta doente nunca se torna um fóco de infecção para as plantas da visinhança. Com esta verificação, MAYER é de opinião que a doença não pode espalhar-se de uma planta infectada para os pés sadios visinhos, quer por contáto, quer por meio de insétos. Entretanto, foi provado mais tarde, por muitos investigadores, entre os quaes F. W. T. HUNGER (10), que a opinião de MAYER, pelo menos no que se refere á disseminação da doença por contáto, é falha, pois HUNGER observou que uma planta doente, numa fileira de 40 plantas, serviu como fóco de infecção para todas as plantas dessa fileira. Tal disseminação realizou-se por intermedio do proprio agricultor que, á procura de lagartas, tocou primeiro na planta doente e em seguida nas plantas sadias.

Está agora provado que o metodo de transmissão por contáto é um dos mais frequentes para o caso do mosaico do fumo. Justamente nas medidas de exclusão da doença pela supressão do contáto baseiam-se atualmente os metodos principais do combate ao mosaico, indicados especialmente por W. D. VALLEAU e E. M. JOHNSON (20) e confirmados por H. J. BUSCH e F. A. WOLF (2), J. C. F. HOPKINS (9), J. JOHNSON (11), T. H. THUNG (19) e outros. Segundo estes trabalhos ficou provado, portanto, que de uma planta infectada a doença pode propagar-se, por contáto, para os pés sadios desse mesmo campo.

Por outro lado, em relação á questão si tambem os insétos podem transmitir a doença de plantas atacadas para pés sadios, poucos

são os trabalhos que encerram resultados experimentais. J. A. Mc-Clintock (12) não obteve resultados positivos, em experiencias de transmissão artificial do mosaico, por meio de insétos sugadores. Ismé Hoggan (6, 7, 8), porém, que realisou experiencias muito detalhadas desde 1929, obteve resultados muito significativos: verificou que o afideo *Myzus persicae* Sulz., o vector responsavel pela disseminação de muitas outras doenças de virus, não transmite o virus do mosaico do fumo. O *Myzus pseudosolani* Theob. tem sómente aptidão de transmitir a doença do tomate para o fumo, mas não do fumo para o fumo. Identico comportamento foi constatado em duas outras especies de afideos: o *Macrosiphum solanifolii* Ashm. e o *Myzus circumflexus* Buckt.

Destes resultados pode-se tirar a conclusão de que, em plantações exclusivamente de fumo, a disseminação por insétos não tem grande importancia. Esta conclusão é confirmada pelas observações feitas pelos varios autores que estudaram a disseminação da doença nos campos. No correr dessas observações notou-se tambem que a distribuição das plantas doentes num campo é muito irregular; isso levou ainda Mayer a admitir uma não dependencia entre a disseminação da doença e o numero de pés previamente atacados. Muitas vezes, diz ele, encontram-se na visinhança de um fóco duas ou mais plantas doentes, mas, em outros casos, as plantas doentes estão isoladas e cercadas de plantas sadias. Essa irregularidade da distribuição das plantas doentes de mosaico, no campo, foi comprovada nos ultimos tempos, especialmente pelas numerosas e detalhadas indicações de Wolf (22, 23). Este autor frizou que a distribuição da doença, a partir de uma só planta doente, não é radial como seria o caso si insétos voadores fossem responsaveis pelo espalhamento da doença.

Que tambem o vento e a chuva não têm grande influencia na distribuição do mosaico, pode-se verificar do fáto de a disseminação não se realizar com maior velocidade na direção principal do vento. Assim, Wolf (23) conclue, á pag. 157: «*All the evidence in hand indicates, that man is the primary agent of dissemination in the field through any cultural operation, in which he effects a contact of diseased and healthy plants*».

Apezar disso, muitos autores, dentre os quaes F. H. Bunker (1), J. C. van der Meer Mohr (14), E. F. S. Shepherd (16) e outros, recomendam, como um dos mais importantes meios de combate, o arrancamento de plantas assim que mostrarem os primeiros sintomas da doença. Com isso tem-se em vista, em primeiro lugar, afastar do campo fócos que podem, por contáto ou pela contaminação do sólo,

provocar uma disseminação da doença. Mas por outro lado, com as referidas medidas, os autores citados pretendem tambem excluir a possibilidade dos insétos se nutrirem em plantas doentes.

Este fator, conforme a literatura antes citada, é insignificante nas plantações exclusivamente de fumo, mas pode atingir uma grande importancia se no campo já existiam plantas doentes de outras especies, a partir das quais os insétos podem transmitir a doença para os pés sadios de fumo.

O numero de especies de Solanaceas selvagens, com as quais foram realizadas pesquisas neste sentido, é diminuto, destacando-se aqui os estudos de HOGGAN. Por isso, fica ainda para resolver o problema si as Solanaceas selvagens encontradas como hervas más em muitos campos de fumo e de tomate, oferecem de fáto aos afideos condições favoraveis para eles transmitirem depois o agente da doença para as plantas cultivadas.

Algumas indicações da literatura parecem depor em favor de uma tal hipotese. Assim, M. W. GARDNER e J. B. KENDRICK (5) conseguiram diminuir a porcentagem de plantas doentes de mosaico, de 14,2 % para 0,43 %, pelo arrancamento, nos campos de tomate, de algumas Solanaceas perenes: *Physalis sub-glabrata, P. virginiana, P. heterophylla* NEES, *Solanum carolinense* L.

Entre os outros autores, que dão muita importancia á extirpação das hervas más, como um meio de combate ao mosaico, mencionamos aqui F. EYLES (4) e B. T. PALM e S. C. J. JOCHEMS (15). Tambem VALLEAU e JOHNSON (21) sem negar a participação das Solanaceas selvagens na disseminação da doença no campo, concedem-lhes porém menor importancia.

Em todo caso, as indicações da literatura não dão ainda uma clara resposta á questão: qual a importancia das hervas más para a disseminação do mosaico do fumo no campo.

## PLANO GERAL DA EXPERIENCIA

Ao passo que os outros autores estudaram a significação das hervas más, comparando campos cuidadosamente extirpados dessas plantas espontaneas, com campos nos quais se permitiu o crescimento voluntario delas, nós seguimos o caminho justamente inverso.

Organisamos 3 campos retangulares, o primeiro composto de plantas de fumo sadias consorciadas a uma especie de Solanacea selvagem, inoculada artificialmente com o virus do mosaico do fumo; o segundo, composto de pés de fumo sadios intercalados com a mesma especie de Solanacea não inoculada e, o ultimo, plantado apenas com fumo e que serviu como testemunha.

A organisação geral deste ensaio foi noticiada por K. SILBERSCHMIDT e M. KRAMER (18), em Julho de 1938.

## MATERIAL E MÉTODO

Conforme havia sido referido na nota preliminar, publicada na data acima referida (18), a plantação foi realizada no principio do outono de 1938 (15-18 de Março), usando-se como fócos de infecção plantas de uma Solanacea selvagem que foi denominada naquela ocasião *Solanum atropurpureum* SCHRANK (= Juá Arrebenta-boi), mas que se verificou agora pertencer á especie *Solanum reflexum* SCHRANK (= Juá bravo).

Esta planta é muito suscetivel á doença e sua ocorrencia é das mais frequentes nos campos e nas roças do Estado de S. Paulo. As plantas de fumo *(Nicotiana tabacum)* eram da variedade *Virginia bright* e foram cedidas para o estudo, por cooperação do Dr. ABELARDO R. LIMA, chefe da Secção de Fumo do Instituto Agronomico de Campinas, a quem agradecemos.

Todas as plantas de nossa experiencia ficaram situadas em 3 terraços de nivel diferente. No terraço superior (que denominamos campo 1), os pés de fumo sadios estavam distribuidos em duas fileiras de 51 plantas cada uma, que alternavam com um numero identico e igualmente arranjado, de pés de Juá bravo, inoculados com o virus de mosaico do fumo. O metodo empregado na inoculação foi o da fricção com os dedos, para o rompimento dos pêlos da folha e penetração mais facil do virus. O inóculo proveio de plantas de fumo, atacadas pela forma tipica do mosaico: essas plantas forneceram folhas que foram reduzidas a pasta, em um almofariz esterilisado, adicionando-se a seguir o mesmo peso do material em agua distilada e filtrando o suco através de etamine. Com esse suco procedeu-se á inoculação dos pés de Juá bravo, em 22 de Março.

O terraço médio (= campo 2) continha 100 plantas de fumo e 72 pés da Solanacea selvagem, ambos sem terem sido inoculados; finalmente, o terraço inferior (= campo 3) tinha sómente duas fileiras de 32 plantas sadias de fumo.

Inspecionámos a experiencia sistematicamente no inicio de cada semana, e essas inspeções duravam até 17 semanas e meia após a inoculação dos pés de Juá bravo, quando foram dadas por encerradas. As notas que vêm a seguir são os resultados dessas observações, condensados em dois items: primeiro, trataremos da disseminação da doença, a partir dos fócos de infecção, durante todo o tempo em que durou a experiencia; como segundo item, referir-nos-emos aos pés do *Solanum reflexum* inoculados com o mosaico, á atividade do virus no

interior dessas plantas e á possibilidade delas servirem como plantas hospedeiras para os insétos. Por ultimo, tiraremos as conclusões praticas dessa experiencia.

1.º) Disseminação da doença. Porcentagem e distribuição dos pés de fumo atacados:

Como as inspeções cuidadosas, efetuadas nos campos 2 e 3, não revelaram nenhum caso de mosaico até o fim da experiencia, subentende-se que nossas observações a esse respeito referem-se apenas ao campo 1. E' fóra de duvida, porém, que neste campo houve uma disseminação do mosaico, dos pés inoculados de Solanum para as plantas de fumo visinhas.

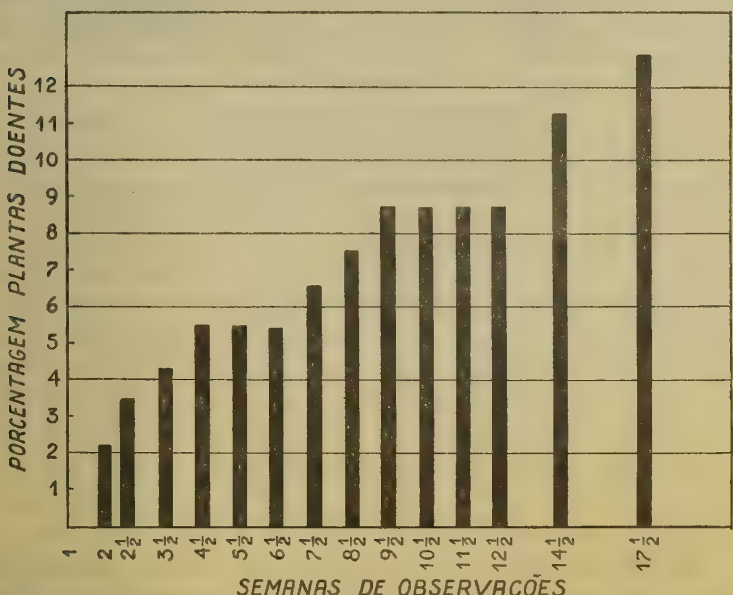



Fig. 1 — Infecção natural das plantas de fumo com o mosaico, no campo que continha fócos de infecção.

O exame da figura 1, onde as ordenadas representam a porcentagem de plantas doentes e as abcissas, as semanas de observação, mostra que as primeiras plantas de fumo atacadas de mosaico foram encontradas duas semanas depois da inoculação dos pés de Juá bravo, uma semana após o mosaico ter sido notado nesta herva má. Essa inspeção revelou 2 pés de fumo com mosaico, entre 96 pés sadios vivos do campo 1, ou sejam 2,12 %.

Os resultados das observações subsequentes indicam que o numero de plantas doentes aumentou na média de uma planta por semana, até o primeiro mez da observação, quando ficou estacionario. Assim, duas semanas e meia após a inoculação dos pés de Juá bravo com o virus do mosaico, existiam 3 pés de fumo doentes, 4 com tres semanas e meia e 5 com 34 dias. Nas duas semanas que se seguiram não foram constatados novos casos da doença, mas, do 52.º dia até a nona semana de inspecção, verificámos o aparecimento de novas plantas doentes. Finalmente, nas inspecções de 6 de Julho e 28 de Julho, o numero de plantas atacadas passou de 8 a 11 e 12 respetivamente, devendo-se notar que nestas duas ultimas observações os sintomas do mosaico sómente foram perceptiveis nas folhas novas dos rebrotos e nas flôres. A tabela 1, a seguir, resume os dados gerais contidos na fig. 1 e dá as porcentagens das plantas doentes nos periodos mais caracteristicos.

TABELA 1

Disseminação natural do mosaico, das hervas más para o fumo

| Dias de exame | Porcentagem de mosaico |
|---|---|
| 7 de Abril | 2,12 |
| 11 » » | 3,19 |
| 18 » » | 4,25 |
| 25 » » | 5,31 |
| 18 » Maio | 6,38 |
| 23 » » | 7,44 |
| 30 » » | 8,51 |
| 6 » Julho | 11,17 |
| 28 » » | 12,76 |

Este quadro põe em evidencia o fáto de ter sido a porcentagem total dos pés de fumo atacados pelo mosaico em Abril, Maio, Junho e Julho, relativamente baixa nas condições de São Paulo, apezar do grande numero de fócos de infecção que usámos e que era o mesmo das plantas de fumo do campo 1.

A distribuição dessas plantas de fumo, infectadas pelo mosaico no campo 1, fornece-nos outros resultados dignos de registo. A figura 2, por exemplo, mostra que, nas duas linhas de fumo, praticamente o mesmo numero de plantas adoeceram e que a localisação dessas plantas não segue uma orientação definida. Tais plantas doentes estavam distribuidas irregularmente e ao longo das duas linhas de plantas de fumo

previamente sadias. Podemos considerar, por isso, que a doença não irradiou a partir de um só fóco de infecção prediléto. Em vista de uma tal distribuição, não uniforme, das plantas de fumo que ficaram contaminadas nas duas linhas, não se pode atribuir aqui tambem á direção dos ventos dominantes, importante papel na disseminação do virus do mosaico do fumo.

4 ++ ++++++++++ +++++++++++++ +++++o+++++++++++o++++

3 oooooooooo● oooooo●oooooooo●oooo●ooooo●ooooooooooo

2 +++++++ ++++++++ +++++++++++++++++ +++++++++++++++

1 oooooo●ooo oooooo●●●ooo●oooooooooooooo●o oooo●oo o

Fig. 2 — Diagrama mostrando, após 3 meses do inicio das experiencias, a localisação das plantas de fumo com o mosaico disseminado a partir das plantas doentes de Juá bravo das fileiras adjacentes. Fileiras 1 e 3, plantas de fumo: o, - localisação das plantas livres do mosaico; ● - localisação das plantas com o mosaico. Fileiras 2 e 4, plantas de Juá bravo: +, - afetadas com mosaico; o, - sadias. Espaços em branco indicam falhas.

Tambem no nosso caso não pudémos observar disseminação da doença a uma certa distancia. Nenhuma das nossas inspecções, efetuadas nos campos 2 e 3, que se achavam a uma distancia relativamente muito pequena de tantos fócos de infecção (10 e 20 metros respetivamente), logrou evidenciar um caso siquer do mosaico nos pés de fumo, durante todo o tempo que durou a experiencia. Mas uma planta de Juá bravo (a de n.º 136, do campo 2) mostrou nas folhas, em 9 de Junho, sintomas caracteristicos de uma doença de virus: pela inoculação do suco dessa planta em folhas de uma planta de *Nicotiana glutinosa,* resultaram lesões locais necroticas, semelhantes ás produzidas pelos virus do mosaico do fumo nesta planta indicadora.

2.º) Comportamento do Juá bravo inoculado com o virus do mosaico do fumo:

As plantas de Juá bravo *(Solanum reflexum),* que usámos como fontes de infecção, são muito suscetiveis ao virus do mosaico do fumo, conforme indicaram as experiencias previas, executadas com a mesma especie, em caixas á prova de insétos. Os resultados dessas pesquisas já foram referidos pelos autores num trabalho anterior (17).

Quanto aos sintomas observados nos pés de Juá bravo inoculados ao ar livre, eles constaram de um mosaico e da deformação das folhas novas, isto é, dos mesmos sintomas já notados nos pés desta especie inoculados no laboratorio. Além disso, as plantas de Juá atacadas de mosaico no campo destacavam-se notavelmente, das plantas de Juá sadias, pelo porte menor e pelas condições tardias de crescimento. (figs. A e B da estampa 12).

As diferenças macroscopicas dessa natureza, existentes ao comparar as plantas de *Solanum reflexum* doentes com as mesmas plantas sadias, foram ainda confirmadas por uma contagem estatistica, que efetuámos ao finalisar a experiencia. Os valores referentes ás médias da altura da haste principal, ao seu diametro e ao numero médio dos frutos produzidos por pé, foram os seguintes:

TABELA 2
Media das dimensões e da produção dos pés de Juá bravo, sadios e inoculados com o mosaico

| Parte da planta | Planta sadia | Planta doente |
|---|---|---|
| 1) altura. . . . . . | 0m,87 | 0m,47 |
| 2) diametro da haste . | 0m,014 | 0m,007 |
| 3) frutos. . . . . . | 26 | 4 |

Vemos, nesta tabela, que a média dos diametros das hastes dos pés sadios é o dobro da dos pés doentes e que quasi outro tanto se poderia dizer da altura das plantas. Quanto á produção dos frutos, os pés sadios produziram mais de seis vezes o numero de frutos que encontrámos nos pés doentes. Podemos acrescentar aqui que na ultima inspecção, de 28 de Julho, encontrámos no campo 1, 8 plantas e no campo 2, 3 plantas mortas, de modo que a contagem para os dados da tabela 2 foi feita a partir de 96 pés doentes de Solanum e 67 pés sadios da mesma especie. Dentre as plantas doentes e sadias, que permaneceram vivas nos dois campos, 37 pés de Solanum doentes não produziram um fruto siquer, ao passo que sómente 7 pés do Solanum sadios deixaram de frutificar. Os resultados destas contagens dão-nos, assim, uma idéa razoavel da ação inhibidora, prejudicial, que o virus do mosaico do fumo tem sobre as Solanaceas selvagens.

## DISCUSSÃO

E' importante mencionar, ainda uma vez, que o mosaico se disseminou exclusivamente no primeiro dos nossos tres campos, quer dizer, no campo onde se achavam os pés de Juá inoculados artificialmente com o virus da doença. Deste resultado pode-se, sem duvida alguma, tirar a conclusão de que a existencia de pés doentes de *Solanum reflexum* no meio de um fumal, tem certa importancia para a disseminação do mosaico do fumo.

Merece tambem notar-se que os pés de fumo do nosso campo não foram cultivados com fins economicos e assim, não foram submetidos aos cuidados culturais, tais como o desbrotamento e a capação.

Estas são operações praticadas comumente nas plantações comerciais, operações ás quais se atribue grande importancia para a transmissão da doença, pelo contáto diréto, com material infeccioso.

Mas, no nosso caso, si a doença não se transmitiu por contáto diréto durante as medidas culturais, por estas não terem sido realizadas, surge então a questão: de que maneira ocorreu, nas nossas condições, a contaminação dos pés sadios?

Deste ponto de vista, em certos casos podia-se admitir um contáto diréto entre as plantas sadias e os pés anteriormente atacados. Tomando em consideração, porém, a distancia relativamente grande que separava uma planta da outra, essa possibilidade de contáto diréto entre as plantas seria viavel apenas numa porcentagem muito baixa dos casos. Portanto, visto excluir-se quasi totalmente a fonte principal da contaminação, que é o contáto dos pés sadios após o manuseamento dos pés doentes, ou dos pés sadios e doentes entre si, resta como ultima explicação para o nosso caso a propagação da doença por meio dos insétos sugadores ou mordedores.

A respeito da propagação da doença pelos insétos, não realizámos ensaios especializados. Durante as inspecções verificámos, no entanto, o gráo de infestação das Solanaceas selvagens e do fumo, pelos insétos, e colecionámos o respetivo material para determinações mais exatas.

Encontrámos nas folhas, especialmente na primeira época do desenvolvimento das plantas, um bezourinho preto (a pulga do fumo = = *Epitrix parvula* FABR.), um hemiptero capsideo (o percevejo do fumo = *Engytatus notatus* DIST.) e um coleoptero verde (a vaquinha das Cucurbitaceas = *Diabrotica speciosa* CRAM.). Afideos não encontrámos na plantação, ou eles ocorriam em quantidade tão pequena que nos passou despercebida. E embora não tenhamos elementos para afirmar que um dos insétos mencionados acima tenha tido importancia na disseminação do mosaico no nosso campo, é bem provavel que, dentre eles, os que agiram como os possiveis vectores da doença não tinham uma grande amplitude de vôo. Isto se confirma pelo estado de sanidade das plantas dos campos 2 e 3, campos estes que não continham fócos da doença mas distavam apenas 10 e 20 metros do primeiro campo, que encerrava 100 fontes de infecção potenciais.

Diante, porém, da possibilidade verificada por alguns investigadores, entre os quais ELMER (3), que estão convencidos do papel que os insétos com armadura bucal trituradora têm para a disseminação do mosaico do fumo, é crivel que os coleopteros indicados possam contribuir, até certo ponto, para a veiculação da doença. Si este fáto tem lugar em nossas condições, fica para ser provado em experiencias

futuras. Estas experiencias devem visar tambem a resolução da questão: qual a influencia do tempo de plantio na disseminação da doença. Com efeito, o resultado que conseguimos nas nossas experiencias, isto é, a disseminação lenta da doença no campo, pode-se provavelmente explicar pela época tardia da plantação, época que talvez seja impropria para o desenvolvimento de certos insétos vectores.

## RESUMO E RESULTADOS PRATICOS

Este trabalho apresenta os primeiros resultados de um estudo, destinado a explicar o curso do desenvolvimento do mosaico do fumo nas condições de campo de São Paulo. Frizamos aqui que esta doença se espalhou apenas num dos nossos tres campos de experiencias, quer dizer, sómente no campo onde colocáramos um numero bastante elevado de plantas de *Solanum reflexum,* artificialmente inoculadas com o virus do mosaico.

No campo onde ocorreu a disseminação da doença, os pés de fumo que aparecerem atacados estavam distribuidos sem ordem ao longo das duas linhas de plantas de fumo previamente sadias, de modo que uma parte do campo não apresentou mais casos de infecção do que a outra parte, nem se notou uma influencia da orientação do campo. Quanto aos outros campos, distantes alguns metros apenas do campo artificialmente contaminado, foi verificado um só caso de contaminação acidental, que teve lugar com uma planta de *Solanum reflexum.*

Em vista desses resultados, com as devidas reservas, podemos tirar algumas consequencias praticas que se referem ao problema do combate ao mosaico do fumo. Como a transmissão da doença, dos fócos de infecção para o fumo, se efetuou a distancia relativamente diminuta, parece-nos superfluo o arrancamento da vegetação selvagem sadia que cresce nos campos de fumo ou na sua visinhança.

Todavia, a erradicação de hervas más infectadas, no meio das culturas, pode provocar uma acentuada redução na infecção das plantas de fumo com o mosaico. Assim, nossas experiencias confirmam a opinião de VALLEAU e JOHNSON (21) de que as hervas más infectadas têm uma significação, ainda que secundaria, para a disseminação da doença do mosaico do fumo.

## ÜBER DIE AUSBREITUNG DES TABAKMOSAIKS IM FELD

### *Zusammenfassung*

*1) Drei kleine Versuchsfelder, die im Abstand von je 10 Metern voneinander auf verschiedenen Höhenstufen angelegt waren, wurden mit je 100 Tabakpflanzen der Varietät Virginia besetzt. Im höchst*

*gelegenen der drei Versuchsfelder waren die 2 Tabaksreihen eingefasst von je 51 Pflanzen von S o l a n u m r e f l e x u m* SCHRANK, *die künstlich mit Mosaikvirus infiziert worden waren. Im zweiten Feld war die Anordnung dieselbe; doch unterblieb hier die künstliche Infektion der Versuchspflanzen von S. r e f l e x u m. Das dritte Versuchsfeld war ausschliesslich mit Tabakpflanzen bestellt.*

*2) Nur im obersten Versuchsfeld liess sich eine Ausbreitung der Erkrankung beobachten. Der Verlauf dieser Ausbreitung ist graphisch in Fig. 1 dargestellt, in der als Abszissen die einzelnen Beobachtungswochen, als Ordinaten die Prozentzahlen erkrankter Pflanzen wiedergegeben sind.*

*Die gleichen Werte, ausgedrückt in Prozenten der Gesamtzahl der jeweils auf dem Feld befindlichen Pflanzen, sind in Tab. 1 zusammengestellt.*

*3) Die räumliche Verteilung der erkrankten Pflanzen im Versuchsfeld ist in Fig. 2 graphisch veranschaulicht.*

*4) In Tab. 2 finden sich Beobachtungen über die Wirkung, welche die Mosaikkrankheit auf Entwicklung und Fruchtansatz von S. r e f l e x u m ausübt, vereinigt.*

*5) Die Ausbreitung der Erkrankung erfolgte ziemlich gleichmässig und führte zu einem im Vergleich mit der grossen Anzahl von Infektionsherden relativ schwachen Krankheitsbefall.*

*6) Fliegende Insekten dürften bei der Verbreitung der Krankheit nur eine untergeordnete Rolle gespielt haben, da die Krankheit nicht auf die nur wenig entfernten beiden anderen Versuchsfelder übergriff.*

*7) Aus den Ergebnissen der Untersuchung lässt sich im Hinblick auf die Bekämpfung der Erkrankung die Schlussfolgerung ziehen, dass ein Ausjäten natürlich vorkommender Solanazeenpflanzen in der Umgebung von Tabakfeldern überflüssig erscheint. In den Pflanzungen selbst ist ein Roden des Unkrautes anzuraten, wenn dieses grossenteils aus Solanazeen, und besonders aus erkrankten Solanazeen besteht.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — BUNKER, F. H. — 1926 — El cultivo de Tabaco en Puerto Rico. Operaciones en el campo. *Rev. Agric. Puerto Rico*, **17**, 32-39. Abs. em R. A. M., 6, p. 323, 1927.

2 — BUSCH, H. J. & F. A. WOLF — 1933 — Manufactured Tobacco, a source of inoculum for mosaic in flue-cured Tobacco. *Phytopath.*, **23**, 839-841.

3 — ELMER, E. O. — 1925 — Transmissibility and pathological effects of the mosaic disease. *Iowa Agr. Exp. Stat. Res. Bul.*, **82**, 39-88 (citado por WOLF, F. A. (23).

4 — EYLES F. — 1926 — Tobacco mosaic in Southern Rhodesia. Selection for resistance. *Rhodesia Agric. Journ.*, 23, 248-252. Abs. em R. A. M. 5, p. 585, 1926.

5 — GARDNER, M. W. & J. B. KENDRICK — 1923 — Field control of tomato mosaic. *Phytopath.*, 13, 372-375.

6 — HOGGAN, I. A. — 1929 — The Peach aphid (Myzus Persicae Sulz.) as an agent in virus transmission. *Phytopath.*, 19, 109-123.

7 — HOGGAN, I. A. — 1931 — Further studies on aphid transmission of plant viruses. *Phytopath.*, 21, 199-211.

8 — HOGGAN, I. A. — 1934 — Transmissibility by aphids of the Tobacco mosaic virus from different hosts. *Journ. Agric. Res.*, 49, 1135-1142.

9 — HOPKINS, J. C. F. — 1928 — Mosaic disease of Tobacco. *Rhodesia Agric. Journ.*, 25, 188-194. Abs. em R A. M. 7, pp. 476-477, 1928.

10 — HUNGER, F. W. T. — 1903 — On the spreading of the mosaic-disease on a tobaccofield. *Extr. du Bull. de l'Inst. Bot. de Buitenzorg*, n.º 17.

11 — JOHNSON, J. — 1937 — Factors relating to the control of ordinary tobacco mosaic. *Journ. Agric. Res.*, 54, 239-373.

12 — MCCLINTOCK, J. A. — 1921 — Overwintering of mosaic of annuals. Abs. em *Phytopath.*, 11, 47.

13 — MAYER, A. — 1886 — Landwirtschaftliche Versuchsstationen, 32, 452. Cit. em Bull. de l'Inst. Bot. de Buitenzorg. n.º 17, 1903.

14 — MOHR, J. C. VAN DER MEER — 1935 — Verslag van het Deli Proefst. over het jaar 1934. *Meded. Deli Proefst.*, Ser. 2. Abs. em R. A. M. 14, p. 658, 1935.

15 — PALM, B. T. & S. C. J. JOCHEMS — 1924 — De voornaamste Tabaksziekten in Deli in verband met de begroeiing der Tabaksgronden. *Bull. Deli Proefst. te Medan-Sumatra*, 20, 64 pp. Abs. em R. A. M. 4, p. 318, 1924.

16 — SHEPHERD, E. F. S. — 1936 — Botanical and Mycological Division, *Rep. Dep. Agric. Mauritius*, 1935, pp. 23-26. Abs. em R. A. M. 16, p. 516, 1937.

17 — SILBERSCHMIDT, K. & M. KRAMER — 1938 — Contribuição para o conhecimento do mosaico do fumo e dos seus hospedeiros selvagens no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9, 1-20.

18 — SILBERSCHMIDT, K. & M. KRAMER — 1938 — A importancia das hervas más para a disseminação do mosaico do fumo. *O Biologico*, São Paulo, 4, 163-164.

19 — THUNG, T. H. — 1937 — Phytopathologische waarnemingen. *Meded. Proefstat. Vorstenl. Tab.*, 84, 25-42. Abs. em R. A. M., 16, pp. 779-780, 1937.

20 — VALLEAU, W. D. & E. M. JOHNSON — 1927 — Commercial tobaccos and cured leaf as a source of mosaic disease in tobacco. *Phytopath.*, 17, 513-522.

21 — VALLEAU, W. D. & E. M. JOHNSON — 1937 — Tobacco mosaic. Sources of infection and control. *Bull. Ky. Agric. Exp. Stat.*, 376, 221-262. Abs. em R. A. M. 17, pp. 560-561, 1938.

22 — WOLF, F. A. — 1931 — Epiphytology of Tobacco mosaic in North Carolina. Abs. em *Phytopath.*, 21, 118.

23 — WOLF, F. A. — 1935 — Tobacco diseases and decays. 454 pp., Duke University Press, Durham.

### EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 12

Fig. A — Vista do campo n.º 1 mostrando o porte pequeno das plantas de Juá inoculadas com o mosaico de fumo.
Fig. B — Vista do campo n.º 2 mostrando o porte normal das plantas sadias de Juá.

———o———



*A*



*B*

# A PROPÓSITO DE "POSTHARMOSTOMUM COMMUTATUM (DIESING, 1858)"

POR

C. Pereira e R. Cuocolo

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 3 figuras no texto e estampas 13-14

Em trabalho recente F. DA FONSECA teve oportunidade de referir o encontro de uma espécie atribuida ao gênero *Brachylaemus,* parasitando os cecos de galinhas adquiridas no mercado de S. Paulo, a qual foi considerada nova, recebendo a denominação de *B. fleuryi* F. DA FONSECA, 1939.

Como, a seguir, a Secção de Ornitopatologia do Instituto Biologico tivesse encontrado três fócos do mesmo parasita na Capital e seus arredores, cujo material veio ter às nossas mãos, por obséquio do Dr. J. REIS, a quem muito agradecemos, tivemos a oportunidade de fazer um estudo cuidadoso do referido parasito, do qual muitos detalhes interessantes não tinham sido referidos na descrição original.

Antes de fazermos o necessário estudo bibliográfico da questão, guiando-nos apenas, como rotina, pelas informações contidas na obra de NEVEU-LEMAIRE (1936), consideramos nossos exemplares como bôa espécie e idênticos a *B. fleuryi,* até verificarmos têr êsse tratadista cometido um êrro de 90 % ao transcrever as dimensões das ventosas de *B. hawaiiensis* GUBERLET, 1928.

Entretanto, como o conceito de espécie nêste grupo é questão muito debatida, resolvemos estudar detidamente os achados anteriores de espécies dêste gênero em galinhas, deixando de lado a discussão de espécies que ocorrem em outros hospedeiros.

Em 1852, WAGENER descrevia e publicava a primeira figura de uma espécie dêste grupo, parasita de galinha, em Pisa (Italia), sob o nome de *Distomum dimorphum* DIESING, 1839, cometendo-se assim o primeiro êrro, pois desde 1855 DIESING já fazia notar que a espécie descrita por WAGENER não correspondia ao seu *D. dimorphum.* Mais tarde, DIESING corrigiu o êrro de WAGENER, denominando o parasito de galinha *D. commutatum* DIESING, 1858.

Sob esta última denominação, porém, no gênero *Mesogonimus,* foi assinalado, mas sem estudos detalhados, por SONSINO (1889, 1891) em Pisa, BARBAGALLO (1906) na Catânia e GALLI-VALERIO (1894, 1901) em Milão.

Quanto à denominação genérica, DUJARDIN havia creado para trematoides do mesmo tipo, parasitos da musaranha, o gênero *Brachylaima* DUJARDIN, 1843, que foi corrigido por BLANCHARD (1847) para *Brachylaemus,* tendo como espécie-tipo, por designação de STILES e HASSAL (1898), *B. advena* (DUJARDIN, 1843).

Posteriormente foi creado o gênero *Harmostomum* BRAUN, 1899, para abranger as espécies do grupo, sendo entretanto colocado na sinonímia da *Brachylaemus* por JOYEUX e FOLEY (1930).

Dêste modo o parasito de galinhas encontrado por WAGENER em 1852 passou a denominar-se *Brachylaemus commutatus* (DIESING, 1858).

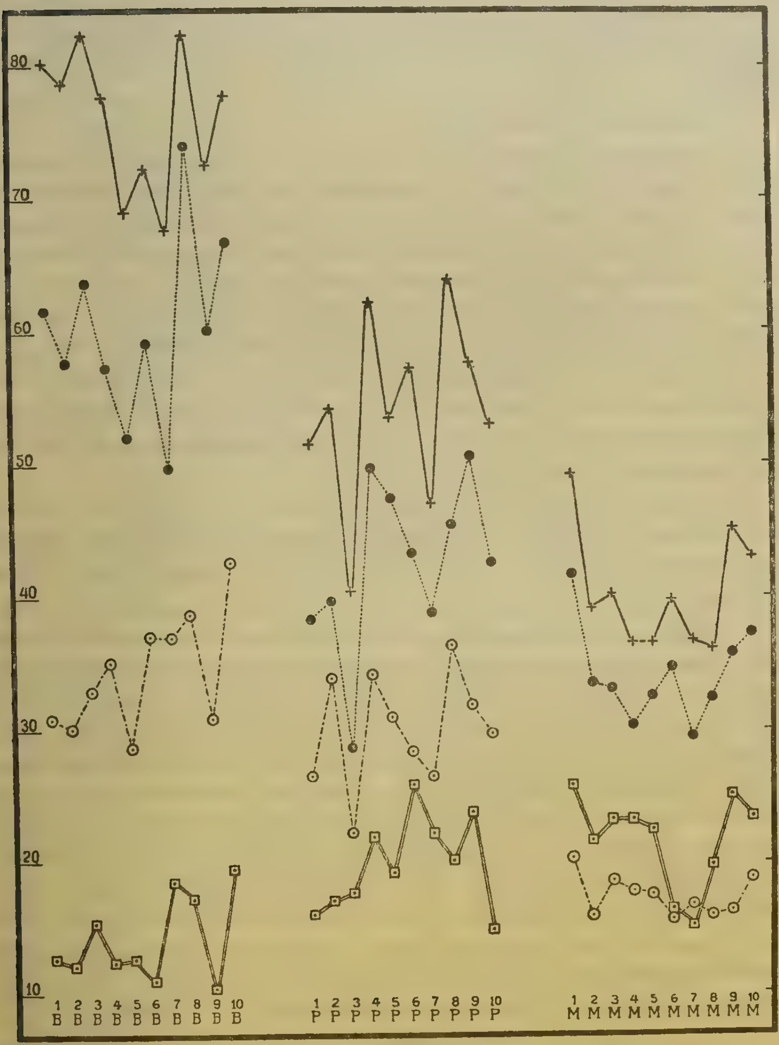
Esta espécie foi encontrada novamente na Tunísia e bem estudada por JOYEUX (1923).

Ainda em 1923, WITENBERG *in* SKRIABIN creou o gênero e espécie *Postharmostomum gallinum* WIT., 1923, para um trematoide de galinhas do Turkestão, considerando-o diferente de *B. commutatus,* principalmente pela forma arredondada da ventosa oral, cecos sinuosos, poro genital atrás do bordo anterior do testículo anterior e disposição das alças uterinas que sáem alternadamente dos ramos medianos anterior e recurrente do útero. Em 1925, em sua monografia, WITENBERG reduz *Postharmostomum* à categoria de subgênero de *Harmostomum,* tendo como tipo *H. P. gallinum*, com vitelogeneos que não vão além da margem posterior do acetábulo, anteriormente.

JOYEUX e HOUDEMER (1928) negam a validez de *gallinum,* com o que não concordam TRAVASSOS (1928) e YAMAGUTI (1933), baseados na diferença de extensão anterior dos vitelogeneos, acima assinalada.

Entretanto, JOYEUX, BAER e TIMON-DAVID (1934) insistem no fato de *gallinus* ser sinônimo de *commutatus,* trazendo em favor dêste ponto de vista uma argumentação que nos parece extremamente interessante: o carater primordial de *commutatus,* isto é, a terminação da extremidade anterior dos vitelogeneos ao nivel da origem dos cecos, só é figurado no desenho de WAGENER (1852), o qual contém inexatidões que atualmente são consideradas muito grosseiras, tais como a interpretação errónea de ovário e testículos, confusão da bolsa do cirro e metratêrmo, do útero e da vesícula seminal, etc.. Como naquela época o desenho científico ainda não podia socorrer-se da câmara-clara ou aparelhos equivalentes, podendo portanto a fantasia dos autores completar comodamente no desenho todas as deficiências técnicas de exame do material, e como o desenho de WAGENER contém vários êrros evidentes, acham os autores citados que «é permitido crêr que o desenho em questão não seja de uma rigorosa exatidão no que diz respeito à terminação dos vitelogeneos». Parece-nos que o ponto de

GRÁFICO 1




*P. commutatum:* dimensões relativas expressas em porcentagens da largura do corpo: ventosa oral (traços contínuos); acetábulo (pontilhado); bulbo faringeano (traço-ponto); distância entre as ventosas, expressa em porcentagens do comprimento do corpo (duplo traço). Exemplares representados pela letra *B*, os da tabela 2; pela letra *P*, os da tabela 1; pela letra *M*, os da tabela 3.

vista de JOYEUX e colaboradores é o mais acertado, principalmente quando se leva em conta o fato de os autores dualistas modernos só encontrarem *gallinus,* mesmo nas zonas de onde foi descrito o *commutatus,* que deveria assim entrar para a categoria das espécies extintas. Realmente, seria mais razoavel considerar extinto o desenho de WAGENER.

Entrementes, novas espécies são descritas dêste grupo, em galinhas, por diversos autores, em zonas muito diferentes: HORIZAWA (1914) encontra em Tóquio um trematoide, que não identifica, denominando-o *Harmostomum* sp.; OZAKI (1925) trabalha com o mesmo material, nomeando-o *Harmostomum horizawai* OZAKI, 1925; RAILLET (1924), descreve, de material proveniente de Huê, no Anam o *H. annamense* RAILLET, 1924; posteriormente, GUBERLET (1928) descreve de Honololu, nas ilhas Havaí, o *H. P. hawiiense* GUBERLET, 1928.

SINITSIN (1931), em sua revisão do grupo, aceita o gênero *Postharmostomum,* tendo como tipo *P. commutatum* (DIESING, 1858) e considera seus sinônimos *gallinum* e *hawaiiense,* ponto de vista que nos parece aceitavel.

JOYEUX, BAER e TIMON-DAVID (1934) aproximam, no gênero *Brachylaemus, annamensis, horizawai* e *hawaiiensis* do a que denominam o «grupo» *commutatus,* sem se definirem claramente quanto à sua sinonímia.

DOLLFUS (1934) aceita a existência de uma única espécie conhecida de *Brachylaemus* nas galinhas, perús e galinhas d'Angola domesticas, que seria o *B. commutatus* (DIESING, 1858) admitindo a possibilidade da existência de variedades, das quais a principal, *gallinus* (WITENBERG, 1923), com vitelogeneos que não vão além do nivel posterior do acetábulo, seria espalhada da sub-região mediterrânea ao Japão, às ilhas Havaí e mesmo até a região indo-chinesa, hipótese que julgamos prejudicada pela argumentação já referida de JOYEUX, BAER e TIMON-DAVID (1934). Acha que *horizawai* (OZAKI) e *annamensis* (RAILL.) seriam tambem uma variedade de *commutatus.*

SPREHN (1932) considera bôas espécies do gênero *Harmostomum: commutatum, annamense* e *hawaiiense,* porém, sem discutí-las; admite a sinonímia de *gallinun* e não se refere a *horizawai.*

NEVEU-LEMAIRE (1936) considera *commutatus (=gallinus), annamensis, hawaiiensis* e *horizawai* como bôas espécies do gênero *Brachylaemus,* dando um quadro de medidas, pelo qual pretende distinguir suas várias espécies parasitas de aves domésticas, abstendo-se tambem de indicar as vantagens de tal procedimento.

*Brachylaemus fleuryi* FONSECA, 1939 é uma espécie que cai perfeitamente bem dentro do «grupo» *commutatum;* não encontramos elementos para distinguí-la desta espécie nem, naturalmente, de suas sinônimas, cuja possibilidade de terem o valor de variedades não nos parece aceitavel, motivo pelo qual considerâmo-la, ao lado de *gallinum, annamense, horizawai* e *hawaiiense* entre os sinônimos de *Postharmostomum commutatum* (DIESING, 1858).

## *Postharmostomum commutatum* (DIESING, 1858)

Sinonímia:

*Distomum dimorphum* WAGENER, 1852 *nec* DIESING, 1839.
*Distomum commutatum* DIESING, 1858.
*Mesogonimus commutatus* (DIESING, 1858) SONSINO, 1889.
*Mesogonimus dimorphus* (WAGENER, 1852) GALLI-VALLERIO, 1901.
*Harmostomum commutatum* (DIESING, 1858) BRAUN, 1889.
*Postharmostomum gallinum* WITENBERG, 1923.
*Harmostomum annamense* RAILLIET, 1924.
*Harmostomum* (*Postharmostomum*) *gallinum* (WITENBERG, 1923) WITENBERG, 1925.
*Harmostomum horizawai* OZAKI, 1925.
*Harmostomum (Postharmostomum) hawiiense* GUBERLLET, 1928.
*Brachylaemus commutatus* (DIESING, 1858) JOYEUX et FOLEY, 1930.
*Postharmostomum commutatum* (DIESING, 1858) SINITSIN, 1931.
*Brachylaemus fleuryi* FONSECA, 1939.

Corpo achatado dorso-ventralmente, alongado, fusiforme, com a extremidade caudal mais ou menos aguda e a cefálica arredondada, limitada pelo bordo anterior da ventosa oral, apresentando maior largura na união dos dois têrços anteriores com o têrço posterior. Em geral, duas constricções laterais: a primeira mais ou menos ao nivel do bordo posterior da ventosa oral; a segunda, menos frequente, ao nivel ou um pouco abaixo do eixo transverso do acetábulo. Pouco espêssos. Porte muito variável. Cutícula lisa, raramente apresentando pregas, pouco evidentes.

Acetábulo: — ventral, mediano, preequatorial, na união do têrço anterior com os dois terços posteriores, dividindo o corpo em duas porções na razão de 1 : 2. A distância entre a zona acetabular e a da ventosa oral é variável e proporcional ao comprimento do corpo. Forma variável, frequentemente circular ou elíptica, de maior eixo transversal. Fortemente muscular, com estriação radial muito densa e estrias concêntricas menos densas. Contôrno espêsso, mais uniforme e mais delgado que o da ventosa oral. Fundo em calota esférica. Dimensões variáveis, menor que a ventosa oral. Tamanho relativo consideravelmente maior nos exemplares de pequeno porte.

APARELHO DIGESTIVO: — ventosa oral, subterminal, ventral, geralmente elíptica, com maior eixo transversal, raramente circular, fundo afunilado. Contôrno saliente e obtuso, mais espêsso na porção posterior. Fortemente muscular, estriação radial mais densa que a circular, fibras cruzadas em tôrno da bôca. Dimensões variáveis, maior que o acetábulo, relativamente maior nos animais de pequeno porte. Bôca, no fundo da ventosa oral, geralmente em

forma de fenda de contôrno elíptico, com maior eixo transversal, medindo êste de 0,1414 a 0,3030 mm. Esôfago, muito curto. Prefaringe ausente. Bulbo faringeano, volumoso, relativamente maior nos animais de pequeno porte; forma variável, dependente do estado de contração, alongado, piriforme, esferoidal, geralmente mais dilatado na porção basal, paredes musculares muito espêssas, mostrando às vezes um grande número de células mioepiteliais volumosas de contôrno estrelado. Cecos intestinais, com origem comum na base do bulbo faringeano em uma espécie de fúrcula; parêdes muito delgadas e luz muito variável em diâmetro; percurso complicado, a princípio dirigidos para a frente e lateralmente, com as paredes mediais juxtapostas às paredes laterais do bulbo faringeano na sua metade posterior; afastam-se gradativamente do bulbo e próximo ao bordo posterior da ventosa oral descrevem um cotovêlo obtuso, voltando-se para fora e distalmente, atingem as margens do corpo e após pequeno trecho retilíneo, de menos de milímetro, descrevem amplas sinuosidades, cujos campos quasi se tocam na linha mediana; essas alças são mais ou menos variáveis de indivíduo para indivíduo, mas em nossas amostras pareceu constante uma alça cecal da esquerda abraçando o testículo proximal e uma da direita fazendo o mesmo com o ovário. Portanto, a área cecal se mostra profundamente recortada, às vezes quasi segmentada. Terminam em fundo de saco muito próximos da extremidade caudal, quasi juxtapostos. Em geral, principalmente em cecos de luz restrita, observamos prolongamentos sacciformes, curtos e dilatados na sua porção terminal, muito frequentes na porção caudal dos cecos.

TABELA 1

*P. commutatum:* dimensões em mm. dos parasitos da galinha proveniente de Pirituba.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento . | 7,4000 | 7,5000 | 5,7000 | 8,5000 | 8,0000 | 8,6000 | 8,0000 | 5,4000 | 6,0000 | 5,0000 |
| Largura . . . | 2,0000 | 1,4000 | 2,0000 | 1,3000 | 1,7000 | 1,7500 | 1,7170 | 1,0000 | 1,3000 | 1,3736 |
| Faringe — comprim. | 0,5450 | 0,5050 | 0,4646 | 0,4444 | 0,5252 | 0,5050 | 0,5050 | 0,3434 | 0,4242 | 0,3838 |
| Faringe — largura . | 0,5151 | 0,4444 | 0,4646 | 0,4444 | 0,5252 | 0,4848 | 9,4040 | 0,3838 | 0,4040 | 0,4040 |
| Ventosa oral — d. transv. | 1,0704 | 0,8080 | 0,8888 | 0,8888 | 0,0100 | 1,0100 | 0,8686 | 0,6868 | 0,8080 | 0,9090 |
| Ventosa oral — d. longit. | 0,9898 | 0,7070 | 0,7272 | 0,7272 | 0,8080 | 0,9898 | 0,7474 | 0,5858 | 0,6868 | 0,6262 |
| Acetábulo — d. transv. | 0,9292 | 0,7070 | 0,5454 | 0,6464 | 0,8080 | 0,7272 | 0,6262 | 0,4040 | 0,6262 | 0,5858 |
| Acetábulo — d. longit. | 0,6060 | 0,4040 | 0,6060 | 0,6464 | 0,8080 | 0,7878 | 0,7070 | 0,5050 | 0,6868 | 0,5858 |
| Dist. bpVO. ao baA. . | 1,1918 | 1,2828 | 0,9090 | 1,8584 | 1,5352 | 2,2220 | 1,7776 | 1,1312 | 1,4848 | 0,7474 |
| Testículos — proximal. | 0,7676 | 0,7070 | 0,5656 | 0,5454 | 0,6060 | 0,5656 | 0,7474 | 0,3636 | 0,4242 | 0,5050 |
| Testículos — distal . . | 0,6262 | 0,6868 | 0,5050 | 0,7070 | 0,8080 | 0,8080 | 0,8080 | 0,5858 | 0,4646 | 0,5252 |
| Ovário . . . . | 0,5050 | 0,4444 | 0,3838 | 0,4242 | 0,4848 | 0,5050 | 0,4646 | 0,3636 | 0,2424 | 0,2424 |
| Ovos . . . . | 0,0289 × 0,0165 | 0,0331 × 0,0165 | 0,0289 × 0,0165 | 0,0331 × 0,0165 | 0,0289 × 0,0165 | 0,0310 × 0,0165 | 0,0310 × 0,0165 | 0,0289 × 0,0165 | 0,0289 × 0,0165 | 0,0310 × 0,0165 |

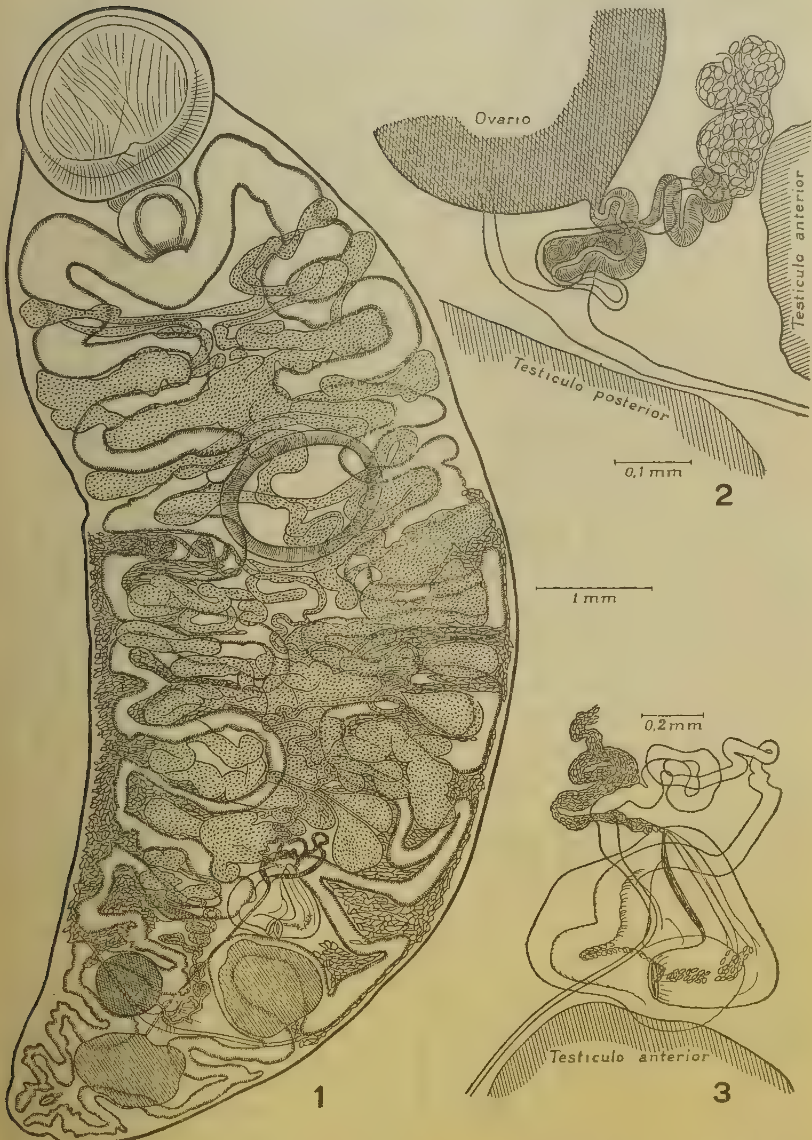



Fig. 1 - *P. commutatum:* total. Fig. 2 - *idem:* área interovário-testicular. Fig. 3 - *idem:* porção terminal dos aparelhos genitais.

TABELA 2

*P. commutatum*: dimensões em mm. do lote de parasitos pequenos da galinha proveniente de Butantan.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento | | 1,90925 | 1,30920 | 1,96380 | 1,66105 | 2,07290 | 1,63650 | 2,18200 | 2,50930 | 1,90925 | 1,96380 |
| Largura | | 0,49095 | 0,43640 | 0,49095 | 0,54540 | 0,60005 | 0,54550 | 0,70915 | 0,62620 | 0,65460 | 0,54540 |
| Faringe | comprimento | 0,16160 | 0,14140 | 0,20200 | 0,20200 | 0,16160 | 0,20200 | 0,22220 | 0,20200 | 0,20200 | 0,26260 |
| | largura | 0,14140 | 0,12120 | 0,12120 | 0,18180 | 0,18180 | 0,20200 | 0,30300 | 0,28280 | 0,20200 | 0,20200 |
| Ventosa oral | d. trans. | 0,46460 | 0,36360 | 0,42420 | 0,46460 | 0,46460 | 0,44440 | 0,53530 | 0,60600 | 0,54540 | 0,44440 |
| | d. long. | 0,32320 | 0,32320 | 0,38380 | 0,38308 | 0,36360 | 0,34340 | 0,42420 | 0,42420 | 0,40400 | 0,40400 |
| Acetábulo. | d. trans. | 0,28280 | 0,26260 | 0,32320 | 0,32320 | 0,32320 | 0,32320 | 0,40400 | 0,46460 | 0,42420 | 0,34340 |
| | d. long. | 0,32320 | 0,24240 | 0,30300 | 0,30300 | 0,30300 | 0,32320 | 0,30300 | 0,46460 | 0,36360 | 0,38380 |
| Dist. bpVO. ao baA. | | 0,24240 | 0,16160 | 0,30300 | 0,21210 | 0,26260 | 0,18180 | 0,40400 | 0,44440 | 0,20200 | 0,38380 |

TABELA 3

*P. commutatum*: dimensões em mm. dos parasitos da galinha proveniente da Mooca.

| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Comprimento | | 11,50000 | 10,60000 | 10,00000 | 10,70000 | 10,50090 | 9,49000 | 10,00000 | 8,29000 | 9,50000 | 8,30000 |
| Largura | | 3,00000 | 2,72750 | 2,45475 | 2,67295 | 2,78205 | 2,80780 | 3,67640 | 3,23290 | 3,49120 | 3,030000 |
| Faringe | comprimento | 0,56560 | 0,44440 | 0,46460 | 0,46460 | 0.50500 | 0,40400 | 0,54540 | 0.48480 | 0,50500 | 0,505090 |
| | largura | 0,64640 | 0,42420 | 0,44440 | 0,48480 | 0,46460 | 0,46460 | 0,68680 | 0,54540 | 0,62620 | 0,62620 |
| Ventosa oral | d. transv. | 1,59580 | 1,09080 | 1,01000 | 0.96960 | 1,01009 | 1,11100 | 1,35340 | 1,19180 | 1,61600 | 1,31300 |
| | d. longit. | 1,35350 | 1,03020 | 0,96960 | 0,96960 | 1,01000 | 1,11100 | 1,33320 | 1,13129 | 1,51500 | 1,27260 |
| Acetábulo. | d. transv. | 1,28270 | 0,90900 | 0,80800 | 0,80800 | 0,90900 | 0,98980 | 1,15140 | 1,09080 | 1,33320 | 1,15140 |
| | d. longit. | 1,21200 | 0,90900 | 0,80800 | 0,80800 | 0,90900 | 0,94940 | 1,01000 | 0,98980 | 1,15140 | 1,09080 |
| Dist. b. p. VO ao b. a. A. | | 2,94570 | 2,28260 | 2,3028 | 2,46440 | 2,34320 | 1,53520 | 1,51500 | 1,61600 | 2,37287 | 1,93920 |
| Testículos | proximal | 1,13120 | 1,09080 | 0,68680 | 0,82820 | 0,78780 | 0,90900 | 1,19180 | 1,11100 | 0,84840 | 0,98980 |
| | distal | 1,07060 | 1,21200 | 0,94940 | 0,94940 | 0,90900 | 0,86860 | 1,03020 | 1,07060 | 0,96960 | 1,17160 |
| Ovário | | 0,68680 | 0,50500 | 0,56560 | 0,60600 | 0,50500 | 0,76760 | 0,66660 | 0,70700 | 0,54540 | 0,60600 |
| Ovos | | 0,03312 | 0,03312 | 0,03312 | 0,03312 | 0,03228 | 0,03228 | 0,03105 | 0,03312 | 0,03312 | 0,03312 |
| | | 0,01656 | 0,02070 | 0,01863 | 0,01656 | 0,01644 | 0,01644 | 0,01656 | 0,01866 | 0,02070 | 0,01863 |
| | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Aparelho Excretor: — nossos exemplares só evidenciaram a parte terminal do tronco do *Y* da vesícula excretora e o poro excretor. Poro excretor: — compreendido entre as duas porções terminais dos cecos, em forma de fenda longitudinal com bordos musculares.

Aparelho Genital ♂: — testículos, em número de dois, volumosos, situados caudalmente, no quarto posterior do corpo, com as zonas vizinhas, mas separadas e campos em grande parte coincidentes: o proximal ou anterior, à esquerda da linha mediana, mais ou menos na união dos três quartos anteriores com o quarto posterior do corpo, de forma e dimensões variáveis, em geral lobado, abraçado por uma alça cecal esquerda, bordejado inferiormente pelo viteloducto esquerdo, podendo sua zona estabelecer ou não contato com a zona ovariana; o distal ou posterior, intercecal, cuja área pode exceder a área cecal devido à reintrância das alças intestinais, próximo à extremidade caudal, tambem de forma e dimensões variáveis, em geral trilobado, um tanto deslocado para a esquerda, mais alongado que o proximal, geralmente com maior eixo dirigido da esquerda para a direita e de diante para trás, com seu campo em parte coincidente com os campos ovariano e testicular anterior e zona visinha ou em parte coincidente com a ovariana. Canais eferentes, partindo das faces anteriores dos testículos, de paredes delgadas e calibre diminuto (cêrca de 0,02 mm.), de percurso quasi retilíneo; o do proximal curto e dirigido para frente e para direita; o do distal, longo, dirigido para frente praticamente em sentido longitudinal; unem-se a um nivel mais anterior ao dos poros genitais, próximo à raiz do cirro e do metratêrmo, dando o canal deferente. Vesícula seminal, tambem de parêdes delgadas, mas com luz consideravelmente maior (cêrca de 0,1 mm) e percurso muito irregular. Cirro, muito volumoso, evaginavel, musculoso, de parêdes espêssas e lisas, luz ampla, em geral cilíndrico ou um tanto dilatado na base, muitas vezes encurvado sôbre si mesmo, com dimensões muito variáveis. Bolsa do cirro, pouco desenvolvida. Poro genital masculino, aberto junto e à direita do poro genital feminino, em nivel variável, imediatamente anterior e às vezes medial à área testicular anterior.

Aparelho Genital ♀: — ovário, impar, com campo deslocado lateralmente para a direita, geralmente visinho, mas separado do testicular anterior, em parte coincidente com o testicular posterior; sua zona é intermediária às zonas testiculares, mas parcialmente coincidente com ambas; forma variável, porém mais definida que a dos testículos, em geral reniforme, ovoidal ou esferoidal, sempre com maior eixo longitudinal; porção caudal mais dilatada; dimensões inferiores às dos testículos, porém mais constantes; abraçado por uma alça cecal da direita e cruzado pelo viteloducto do mesmo lado. Oviducto, partindo da porção mediana da face medial do ovário, muito curto, abrindo-se no ootipo. Ootipo, relativamente volumoso, mais ou menos piriforme, com maior eixo transversal. Útero, originando-se no ootipo, entre as áreas ovariana e testicular anterior, dirige-se anteriormente com percurso dorsal e muito sinuoso (ramo anterior), emitindo numerosas alças laterais, frequentemente dilatadas em formações claviformes, junto aos bordos do corpo, atinge um nivel variável, em geral a fúrcula cecal ou um pouco para frente, volta-se ventralmente (ramo recurrente) e, ainda com percurso irregular e emitindo alças laterais que se alternam com as do ramo anterior, dirige-se novamente para a extremidade caudal, terminando no metratêrmo. Metratêrmo, muito longo e de parêdes muito espêssas, com maior diâmetro na base, descreve uma curva com a concavidade voltada para a di-

reita, terminando ventralmente junto ao poro genital masculino. Vitelogeneos, constituidos por um par de glândulas situadas na área extracecal, penetrando as depressões laterais deixadas pelas alças intestinais, formadas por um grande número de folículos cuja zona se estende desde as proximidades da zona ovariana até se confundir ligeiramente com a zona acetabular, não passando da região correspondente ao eixo transverso do acetábulo. Viteloductos, um para cada glândula, de calibre regular, unidos mais ou menos na linha mediana, logo adiante do bordo anterior do testículo distal, posteriormente ao ootipo, à esquerda do ovário, numa expansão de contôrno triangular, cujos vértices basais correspondem à entrada dos viteloductos e o vértice superior à saída do viteloducto comum; êste, de percurso um tanto sinuoso e dirigido anteriormente e um pouco para a direita, desembocando no ootipo. O viteloducto da esquerda bordeja a margem distal do testículo proximal, emquanto sistematicamente o da direita cruza o ovário de diante para trás e da direita para a esquerda. Glândula de Mehlis, muito volumosa, de contôrno mais ou menos circular, disposta em tôrno do ootipo. Canal de Laurer, partindo do ootipo, de calibre mais ou menos considerável, com percurso sinuoso e aberto dorsalmente. Ovos, numerosos, de casca espêssa, corada de castanho escuro, elipsoidais.

Hospedeiro definitivo: — galinha doméstica (*Gallus gallus* (L.)).

Localização: — ceco.

Procedência: — São Paulo (Moóca, Butantan, Pirituba). Estado de São Paulo. Brasil.

## DISCUSSÃO

O facto de só em 1930 encontrar-se em São Paulo o *Postharmostomum commutatum,* quando já é tão grande o número de aves examinadas na Secção de Ornitopatologia do Instituto Biologico, leva-nos a fazer alguns comentários sôbre êste achado tão tardio, de um parasito cosmopolita, que tem sido encontrado em vários lugares das regiões temperadas e tropicais.

Ha três motivos de ordem geral que permitem compreender o fenômeno:

O primeiro muito bem observado por Lutz (1895) ao descrever *Brachylaemus opisthotrias* (Lutz, 1895), parasito de gambás em S. Paulo, consiste em os trematoides dêste tipo passarem por um estado adulto provavelmente de curta duração, o que é atestado pela franca desintegração dos testículos e vitelogêneos nos exemplares mais bem desenvolvidos, assim como pela tendência à eliminação dos exemplares cheios de ovos, que são encontrados em situação cada vez mais baixa no intestino quanto mais ovos contém, sendo justamente êstes exemplares os que apresentam maior degeneração de testículos e vitelogêneos.

O segundo foi evidenciado por Dollfus, Callot e Desportes (1935) ao infestarem aves estrigiformes com uma espécie não identi-

ficada do gênero *Brachylaemus,* conseguindo evidenciar que a produção de ovos do parasito já começava dois dias depois da ingestão de metacercárias pela ave. Joyeux, Baer e Timon-David (1934) demonstraram que *B. fuscatus* (Rud., 1819) do pardal, começa a produzir ovos até o sexto dia de infestação da ave.

O terceiro motivo consiste em haver nêste grupo um grande desperdício de cercárias quando elas migram para a glândula renal no hospedeiro intermediário, afim de se transformarem em metacercárias, como foi demonstrado por Sinitsin (1931) e Joyeux, Baer e Timon-David (1932) *a* e *b*).

Ora, um parasito que só é adquirido pela ingestação do molusco infestado, que atinge a maturidade sexual rapidamente e que é eliminado em prazo relativamente curto, torna-se dificil de ser encontrado em aves provenientes de granjas ou então nas que permaneceram em cativeiro por algum tempo antes de serem abatidas. Torna-se necessário procurá-lo nas aves criadas em condições primitivas, semi-naturais e trazidas recentemente para o laboratório, como foi o caso nos três achados realizados pela Secção de Ornitopatologia do Instituto Biologico.

Outro fato interessante que fica explicado, é o de os parasitos se apresentarem em lotes relativamente homogêneos, quanto ao seu desenvolvimento: uma das galinhas (tabela 1) teve parasitos cujo comprimento oscilava entre 5,0 e 8,6 mm.; outra galinha apresentou dois lotes, naturalmente provenientes de duas infestações diferentes, um com comprimentos entre 1,3 e 2,5 mm. (tabela 2) outro com dimensões da mesma ordem que as dos parasitos da primeira galinha; a terceira galinha teve seus parasitos medindo de 8,2 a 11,5 mm. de comprimento (tabela 3).

O número de exemplares desta espécie, que tivemos a oportunidade de examinar, permite-nos abordar alguns pontos de sua morfologia que nos parecem interessantes.

Comparando as dimensões da ventosa oral, acetábulo e faringe com a largura do corpo, bem como a distância entre as ventosas, com o comprimento dêle (gráfico 1), verifica-se que as três primeiras dimensões são inversamente proporcionais ao tamanho do animal, sendo portanto relativamente muito maiores nos exemplares novos, o que exige muita cautela na identificação da espécie e demonstra uma diferenciação mais precoce destas formações; a distância entre as ventosas aumenta com o crescimento do parasito.

Os cecos intestinais apresentam-se em todos os nossos exemplares com um comportamento inteiramente característico, descrevendo

sinuosidades com uma constância notavel e com profundidade tal, que às vezes levava as alças de um lado quasi a tocar nas do outro. No trabalho de FONSECA (1939), o desenho do animal mostra cecos retilíneos, porém no texto é assinalado um «percurso muito sinuoso». Êste percurso cheio de alças é, em nosso material, de tal ordem, que pensamos não se dever confundir com as sinuosidades acidentais ou por contração do material, frequentemente observáveis; em conjunto com a forma da ventosa e disposição das alças uterinas, êle dá inteira validez ao gênero *Postharmostomum* WIT., 1923.

Nos exemplares mais desenvolvidos as alças intestinais chegam a ficar vesiculosas, às vezes como que estranguladas, dando aos parasitos um aspeto mui particular.

Os testículos apresentam uma lobação irregular, mais acentuada no posterior; e seu diâmetro transversal já foi exagerado, principalmente no anterior, por autores que não perceberam uma alça cecal cuja área constantemente se sobrepõe dorsalmente à do testículo anterior, porém excedendo-a anterior e medialmente. Sua consistência é tanto menor quanto mais desenvolvido o exemplar, o que parece acontecer tambem com a lobação, que portanto não pode ter carater específico, no que concordamos com MORISHITA (1929).

A situação do poro genital apresenta-se um tanto variável, mais geralmente nas proximidades ou mesmo em contato com a zona do testículo anterior, às vezes deslocando-se medialmente ao campo do mesmo órgão, o que retira o valor genérico ou subgenérico que lhe foi atribuido por WITENBERG (1923, 1925).

A disposição do útero, tanto no seu percurso anterior como no recurrente, emitindo alças laterais ora para um lado ora para outro, pode ser bem verificada principalmente nos exemplares ainda não repletos de ovos, permanecendo nos plenamente desenvolvidos, onde entretanto se torna muito dificil demonstrá-la. Associado à forma da ventosa oral e à presença das alças cecais, parece-nos dos bons caracteres do gênero.

## ON "POSTHARMOSTOMUM COMMUTATUM (DIESING, 1858)".


### *Abstract*

*The A. A. have found at S. Paulo (Brazil) a trematode parasite from the gut of domestic fowl that was identified as Postharmostomum commutatum* (DIESING, *1858). A detailed account of the morphology of this parasite is given and it's relation to others species of the genus is discussed. They agree with the separation of Postharmostomum* WIT. *from Brachylaemus* DUJ., *having*

*P. commutatum* (DIESING) *as type-species, and accept the view that gallinum* WIT., *annamense* RAILL., *horizawai* OZAKI *and hawaiiense* GUBERLET *are synonyms of commutatum, as well as fleuryi* FONSECA, *a supposed good species recently described at S. Paulo.*

BIBLIOGRAFIA


BLANCHARD, E. — 1847 — Recherches sur l'organisation des vers. (Voyage en Sicile), suite. *Ann. Sc. Nat. Zool.* 3.ª série, 8, 271-341.

BRAUN, M. — 1899 — Ueber Clinostomum Leidy. *Zool. Anz.*, 22, 489-493.

DIESING, K. M. (*) — (1855), 1856 — Neunzehn Arten von Trematoden. *Denkschr. K. Akad. Wissensch. Wien., Math. Naturwiss. Classe*, **10**, 59-70.

DIESING, K. M. (*) — 1858 — Revision der Myzhelminthen. Abt. Trematoden. *Sitzungsber. K. Akad. Wissensch. Wien., Math. Naturwiss. Classe*, **32**, 307-390.

DOLLFUS, R. PH. — 1934 — Sur quelques Brachylaemus de la faune française récoltés principalement a Richelieu (Indre-et-Loire), a suivre. *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.*, **12**, (6), 551-575.

DOLLFUS, R. PH. — 1935 — Sur quelques Brachylaemus de la faune française récoltés principalement a Richelieu (Indre-et-Loire), suit et fin. *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.*, **13**, (1), 52-79.

DOLLFUS, R. PH., CALLOT, J. et DESPORTES C. — 1935 — Infestation expérimentale de strigiformes par un Brachylaemus. *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.*, **13**, (1), 12-20.

DUJARDIN, F. — 1843 — Mémoire sur les helminthes des musaraignes et en particulier sur les Trichosomes, les Distomes et les Ténias, sur leurs métamorphoses et leurs transmigrations. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, 2.ª série **20**, 329-349.

FONSECA, F. DA — 1939 — Novo trematoide parasita da galinha, Brachylaemus fleuryi n. sp. (Brachylaemidae. Fascioloidea). Nota prévia. *Bol. Biol.*, S. Paulo, **4**, (1), 114-116.

GALLI-VALLERIO, B. (*) — 1894 — Note di parassitologia. *Il Moderno zoojatro.* Torino, **22**, 426-432.

GALLI-VALLERIO, B. (*) — 1901 — La collection de parasites du laboratoire d'hygiène et de parasitologie de l'Université de Lausanne. *Bull. soc. vaudoise sc. nat.*, **37**, (4) 343-381.

GUBERLET, J. E. — 1928 — Parasitic worms of hawaiian chickens with description of a new Trematode. *Transact. American Microscop. Soc.*, **47**, 444-451.

HORIZAWA, J. (*) — 1914 — On a trematode obtained from the caecum of the fowl. *Nippon Byori Gakkwai Shi*, **3**, 377-380.

ISHII, N. — 1933 — Studies on bird trematodes. I. Bird Trematodes in Japan. II. Four new Bird Trematodes. *Japan. Jour. of Exp. Med.* **11**, (2) 91-100.

JOYEUX, CH. — 1923 — Recherches sur la faune helminthologique africaine (suite). *Arch. Institut Pasteur Tunis*, **12**, 328-338.

JOYEUX, CH., BAER, J. G. ET TIMON-DAVID, J. — 1932 a. — Le dévelopement du trématode Brachylaemus (Brachylaemus) nicolli (Witenberg). *C. R. Soc. Biol.*, **109**, 464-466.


(*) Não consultado o original.

JOYEUX, CH., BAER, J. G. ET TIMON-DAVID, J. — 1932 b. — Recherches sur le cycle évolutif des Trématodes appartenant ou genre Brachylaemus Dujardin (sin. Harmostomum Braun). *C. R. Ac. Se.*, 195. 972-973.

JOVEUX, CH., BAER, J. G. ET TIMON-DAVID, J. — 1934 — Recherches sur les Trématodes du genre Brachylaemus Dujardin (syn. Harmostomum Braun). *Bull. Biol. France et Belgique*, 68, 385-418.

JOYEUX, CH. ET FOLEY, H. — 1930 — Les helminthes de Meriones shawi Rozet dans le nord de l'Algérie. *Bull. Soc. Zool. de France*, 55, 353-374.

JOYEUX, CH. ET HOUDEMER, E. — 1928 — Recherches sur la faune helminthologique de l'Indochine (Cestodes et Trématodes) (suite et fin). *Ann. Parasitol. Hum. et Comp.*, 6, (1), 27-58.

LUTZ, A. — 1895 — Distoma opisthotrias um novo parasita do gambá. *Rev. Mus. Paulista*, S. Paulo, 1, 181-193.

MORISHITA, K. (*) — 1929 — Some avian Trématodes from Japan, especially from Formosa; with a reference list of all known japanese species. *Annot. Zool. Japon.*, 12, 143-174.

NEVEU-LEMAIRE, M. — 1936 — Traité d'Helminthologie Médicale et Vétérinaire. Vigot Frères, Editeurs. Paris, 216-220.

OZAKI, Y. (*) — 1925 — Sur Harmostoma horizawai et son développement. *Tokyo Iji Shinshi*, 2434.

RAILLIET, A. — 1924 — Les helminthes des animaux domestiques et de l'homme en Indochine. *Bull. Soc. Zool. France*, 49, 589-608.

SINITSIN, D. — 1931 — Studien über die Phylogenie der Trematoden. V. Revision of Harmostominae in the light of new facts from their morphology and life history. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 3, 786-835.

SKRIABIN, K. I. (*) — 1923 — Trematoden der Hausvögel. *Travaux de l'Institut véterinaire expérimental de l'Etat.* Moscou, 1, (2) 193-256.

SONSINO, P. (*) — 1889 — Studi e notizie elmintologiche. *Atti Soc. toscana di sc. natural.* Pisa. *Processi verbali* (1887-1889), 6, 273-285.

SONSINO, P. (*) — 1891 — Notizie di parassiti. *Processi verbali della Soc. Toscana di sc. natural* Pisa, 7, 201-202.

SPREHN, C. E. W. — 1932 — Lehrbuch der Helmithologie. Verlag von Gebrüder Bortraeger, 353-357.

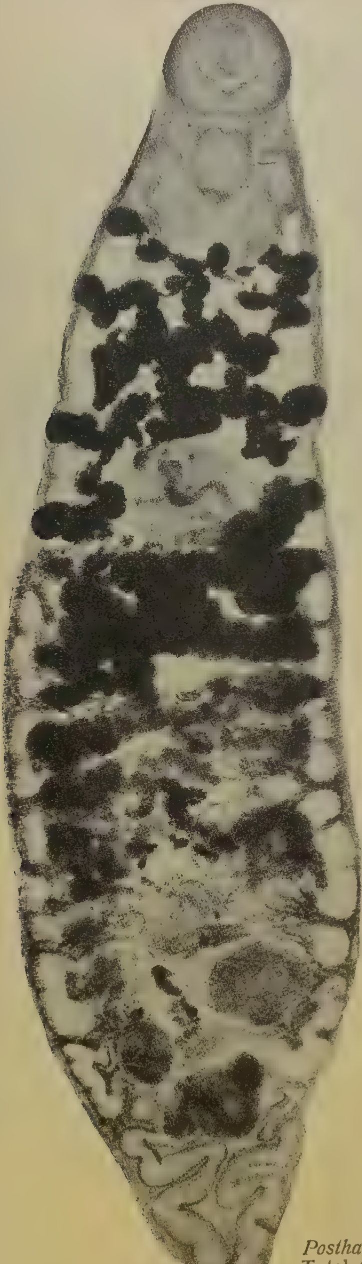
STILES, CH. W. ET HASSAL, A. — 1898 — An inventory of the genera and subgenera of the Trematode family Fascioloidea. *Arch. Parasitol.*, 1, 81-89.

TRAVASSOS, L. — 1928 — Fáuna helminthologica de Matto Grosso (Trematodeos — 1.a parte). *Mem. Inst. Osw. Cruz,* Rio de Janeiro, 21, (2) 309-372.

WAGENER, G. R. (*) — 1852 — Enthelmithica, n.o III. *Archiv. für Anat. Physiol.*, 555-567.

WITENBERG, G. — 1925 — Versuch einer Monographie der Trematoden Unterfamilie Harmostomidae BRAUN. *Zool. Jahrbücher. System.*, 51, 167-254.

YAMAGUTI, S. — 1923 — Studies on the helminth fauna of Japan. Part. I. Trematodes of Birds, Reptiles and Mammals. *Japan Journ. of Zool.*, 5, 1-134.



*Postharmostomum commutatum:*
Total (Federman *et* Mazza *fot.*)



Fig. *A* — *Postharmostomum commutatum:* extremidade posterior (Federman *et* Mazza *fot.*)

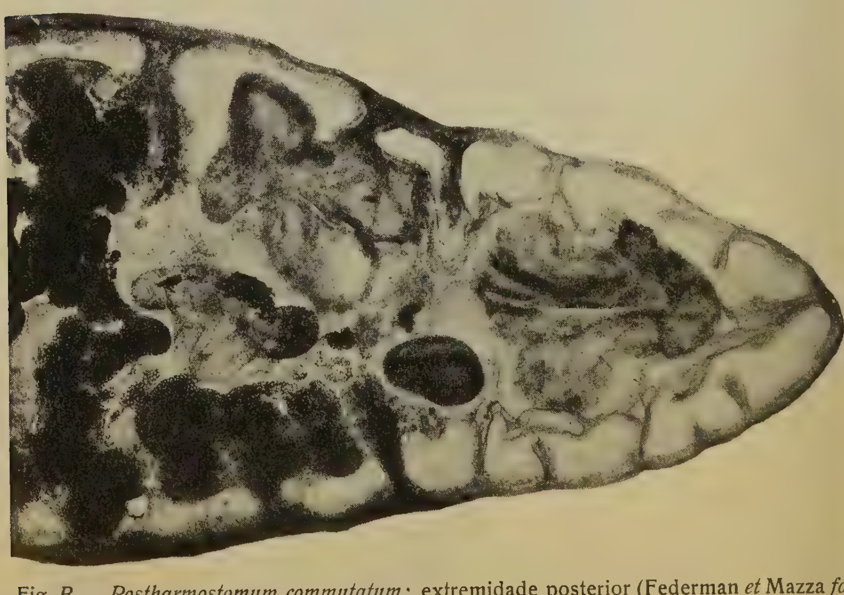


Fig. *B* — *Postharmostomum commutatum:* extremidade posterior (Federman *et* Mazza *fot.*)

Vol. 10 — Art. 5 Setembro de 1939

# REDESCRIÇÃO E NOVOS HOSPEDADORES DE "CAPILLARIA PERFORANS KOTLÁN ET OROSZ, 1931"; NEMATOIDE PATOGENICO PARA AVES DOMESTICAS

POR

Z. Vaz

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 12 figuras no texto e estampa 15

Em Março do ano passado recebemos, para determinação, da Secção de Ornitopatologia do Instituto abundante material de uma especie de *Capillaria* que, ocorrendo no esofago e papo de Angolinhas brancas e de um faisão, produzia-lhes extensas lesões nessas partes do tubo digestivo, sendo provavelmente a causa da morte dos animais atacados, aliás em grande numero. Não discutiremos aqui os aspétos clinicos e anatomo-patologicos, pois que foram desenvolvidos em trabalho de REIS & NOBREGA nesta mesma revista (vol. 9). ([1]).

A epizootia ocorrera em *Numida meleagris,* Angolinhas brancas criadas no parque de Agua Funda pertencente á Diretoria de Industria Animal, e a *Capillaria* encontrada chamava a atenção pelas enormes dimensões apresentadas, verificando-se exemplares de 150 mm. de comprimento, o que não é frequente em especies desse genero.

Posteriormente, em começos de Julho de 1938, a granja Julieta, localisada em St. Amaro, enviou á Secção de Ornitopatologia dois exemplares de galinha da Abyssinia *(Numida ptylorrhyncha* syn. *Numida vulturina),* que á autopsia mostravam no papo e no esofago lesões do mesmo tipo que as verificadas na angolinha branca e no faisão e, nessas lesões, grande quantidade de Capilarias que, examinadas cuidadosamente, mostraram pertencer á mesma especie.

Identificamos o material recebido á *Capillaria perforans,* apezar das duvidas opostas por CRAM (1936) á validez dessa especie.

A *C. perforans* foi descrita por KOTLÁN & OROSZ em 1931 de material encontrado em perú *(Meleagris gallopavo)* da Hungria, produzindo no unico animal examinado extensas alterações patologicas no esofago e no papo. A partir dessa época nunca mais foi assinalada sua presença e, em 1936, MISS E. CRAM, ao fazer a revisão das especies do genero *Capillaria,* parasitos do tracto superior do tubo digestivo de aves, considerou *C. perforans* como especie «inquirendae». CRAM fundamenta sua afirmativa na dificuldade de distinguir *C. perforans* de

---

([1]) Reis & Nobrega — Epizootia em aves domesticas produzida por *Capillaria perforans.*

*C. contorta,* pois, baseando-se na descrição original, o principal caráter diferencial seria o enorme comprimento do espiculo de *C. perforans* o que valeria pouco em vista da falta de dados sobre as dimensões desse orgão em *C. contorta.* Assinalaremos a seguir, as diferenças por nós observadas e que permitem com segurança considerar *C. perforans* boa especie; mas convem assinalar desde já que não procede o argumento de CRAM em relação ao espiculo, pois, se em *C. contorta* é dificil verificar o espiculo e se em *C. perforans* é possivel fazel-o, já está aí uma boa diferença; além do mais, as dimensões do espiculo assinaladas por KOTLÁN & OROSZ para *C. perforans* (14 a 16 mm.) estão muito longe das apresentadas pelos autores que conseguiram medir o espiculo de *C. contorta.*

*Capillaria perforans* KOTLÁN & OROSZ, 1931.

Hospedadores: *Meleagris gallopavo* segundo KOTLÁN & OROSZ — Hungria.
*Numida meleagris* S. Paulo, Brasil.
*Numida ptylorrhyncha* S. Paulo, Brasil.
*Phasianus colchicus* S. Paulo, Brasil.

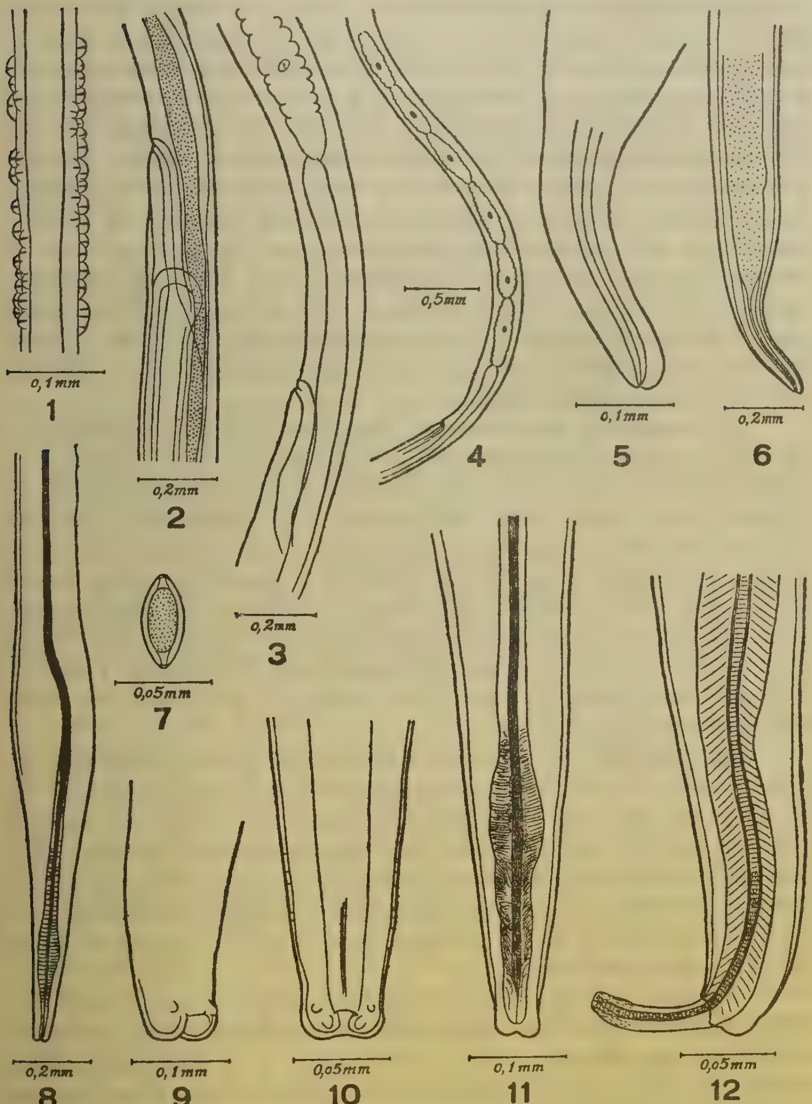
Localisação: Esofago e papo, penetrando na mucosa e submucosa.

Descrição: Capillaria de grandes dimensões, relativamente grossa, de largura mais ou menos homogenea em toda a região posterior do corpo, excéto a porção posterior do macho, que apresenta um alargamento bastante acentuado pouco antes da extremidade final, para depois estreitar-se gradualmente até esta extremidade; chamamos a atenção para este aspéto, pois ele é sempre presente nos machos e, após alguma experiencia, permite separar os exemplares deste sexo á vista desarmada (Fig. 8).

A extremidade posterior da femea (Fig. 6) apresenta aspéto diverso, pois estreita-se bruscamente a mais ou menos 0,26 mm. da ponta e termina assim estreitada sem apresentar a dilatação fusiforme carateristica do macho. A região esofagiana do corpo é sempre mais fina em ambos os sexos.

A cuticula é delicada, transparente, apresentando na região anterior pequenas elevações correspondentes aos bastonetes, mostrando aspéto crenado (Fig. 1). Na região posterior os bastonetes são mais delicados e numerosos, não fazendo salientar a cuticula.

Macho: Mediram 55 a 60 mm. de comprimento os exemplares por nós examinados; a descrição de OROSZ refere dimensões um pouco menores, variando entre 37 e 44 mm.. A largura medida ao nivel da




*Capillaria perforans.* Fig. 1 - Aspeto da cuticula da femea. Fig. 2 - Vulva e vagina. Fig. 3 - Extremidade posterior do esofago e vulva. Fig. 4 - Parte da porção celular do esofago da femea. Fig. 5 - Extremidade posterior da femea. Fig. 6 - Porção posterior do corpo da femea. Fig. 7 - Ovo. Fig. 8 - Porção posterior do corpo do macho. Fig. 9 - Detalhe da extremidade posterior do macho. Fig. 10 - *Idem.* Fig. 11 - Espiculo e bainha. Fig. 12 - Espiculo e bainha fóra do corpo.

terminação do esofago é de 0,12 mm. ao passo que OROSZ verificou uma largura de 0,075 mm. nesse mesmo nivel. O comprimento total do esofago variava entre 9,5 e 10,7 mm. sendo muito pequena a porção inicial, não celular; a relação entre a parte anterior e a posterior do corpo é portanto de 1:5 e isso em todos os exemplares por nós examinados, o que está de acôrdo com o que descreve OROSZ. Extremidade posterior do macho apresentando duas saliencias laterais arredondadas, unidas ventralmente por uma membrana cuticular. A cauda é provida de dois pares de papilas, sendo um par mais anterior de papilas bem visiveis situadas lateralmente logo acima da membrana cuticular já referida; do par posterior cada papila está situada numa das proeminencias laterais e são pouco perceptiveis. No fundo da fenda limitada pelas proeminencias laterais abre-se a cloaca, que é recoberta pela membrana cuticular mediana.

O espiculo é extremamente longo, muito pouco quitinizado e por isso não muito facilmente visivel. Sua largura é sempre homogenea, apresentando-se como uma faixa delicada, dentro de uma bainha de paredes finas, bainha essa que, proximo da extremidade posterior (Fig. 10) se alarga gradualmente até um maximo, para depois estreitar-se tambem gradualmente em direção á cloaca; a parede da bainha espicular é nesse nivel fortemente musculosa e recoberta de espinhos delicados não muito numerosos, de direção anterior. Deve-se notar que o nivel de alargamento da bainha do espinho não corresponde á zona de alargamento do corpo do macho, já descrito, e que ocorre em região mais anterior (Fig. 8).

As dimensões do espiculo verificadas em nossos exemplares variavam entre 12 e 14 mm. em exemplares cujo comprimento total era de 55 a 60 mm.; essas medidas discordam um pouco, em numeros relativos, das referidas por OROSZ, que apresenta para o espiculo dimensões de 14 a 16 mm. em exemplares cujas dimensões totais variam entre 37 a 44 mm.; em nossos exemplares o espiculo apresentava mais ou menos um quarto do comprimento total, e nos de KOTLÄN & OROSZ um terço aproximadamente.

F e m e a: As dimensões das femeas, no grande numero de exemplares examinados por nós, variava entre 57 e 150 mm. de comprimento; as femeas que mediam 57 mm. eram jovens, i. é, não apresentavam ainda ovos no utero. A largura, medida ao nivel de vulva, oscilava entre 0,14 a 0,16 mm. ultrapassando 30 a 50 micra a largura ao mesmo nivel verificado por KOTLÄN & OROSZ nos exemplares da Hungria, que era de 120 micra. A 0,26 mm. da extremidade posterior, o corpo da femea sofre um estreitamento brusco, passando a medir 0,080 mm.

O comprimento total do esofago é variavel; numa femea jovem em que o comprimento do corpo era de 57 mm., o esofago media 10,88 mm. de comprimento, e nas femeas mais desenvolvidas, cujo corpo apresentava 110 mm., o esofago total media 14,2 mm.. As dimensões médias do esofago eram pois de 12,5 mm.. A relação entre a porção anterior e a posterior do corpo varia segundo se trate de exemplares jovens ou adultos. Nas femeas jovens essa relação é de 1:5,3 e nas adultas, de 1:7,7; nos exemplares da Hungria é de 1:7.

O anus (Fig. 5) não é nitidamente terminal; abre-se na face ventral pouco antes da extremidade posterior, que é arredondada. A vulva, que não faz saliencia na cuticula, está situada proximo da extremidade. A vagina é relativamente curta, medindo mais ou menos 0,5 mm., não sendo nitidos os limites com o utero, no qual se continua. Os ovos (Fig. 7) medem 0,041 a 0,049 mm. de comprimento por 0,020 a 0,022 mm. de largura.

M a t e r i a l: Depositado na Coleção Helmintologica do Instituto Biologico de São Paulo, n.º 2.193.

## DISCUSSÃO

Da descrição feita acima acreditamos poder deduzir que *Capillaria perforans* é uma boa especie, apresentando alguns detalhes morfologicos que a distinguem com facilidade de *Capillaria contorta:*

a) Comprimento total do corpo: Todos os exemplares de *C. perforans* por nós observados, provenientes de grande numero de hospedeiros, de localidades diferentes, apresentavam dimensões nunca assinaladas para *C. contorta;* sabemos que o comprimento total não é um bom caráter especifico, mas se considerarmos que femeas jovens, com poucos ou nenhum ovo ainda formado, mediam no minimo 57 mm., i. é, dimensões raras vezes verificadas em femeas bem desenvolvidas de material considerado por Cram como *C. contorta;* considerando ainda as dimensões maximas dos machos e femeas: 57 mm. e 150 mm. respetivamente, que estão muito longe das assinaladas por todos os autores para a *C. contorta,* e por fim, que nossas medidas concordam com as referidas por Orosz, parece-nos que o caráter dimensional passa a ter algum valor.

b) Região posterior do corpo do macho: Em *C. perforans* o corpo do macho apresenta uma zona de alargamento na região posterior (Fig. 8) que não foi descrita para *C. contorta.*

c) O espiculo em *C. perforans,* ainda que delicado, é sempre visivel e extremamente longo; em *C. contorta,* quando visivel, é sempre pelo menos dez vezes mais curto. Cram assinala que quanto

maior o exemplar de *C. contorta* tanto mais dificil é de observar o aparelho espicular, e nos exemplares de 40 a 45 mm. não lhe foi possivel identifica-lo; ora, em *C. perforans,* em todos os machos de 55 a 60 mm., sempre distinguimos o espiculo.

## REDESCRIPTION AND NEW HOSTS OF "CAPILLARIA PERFORANS Kotlán et Orosz, 1931"; PATHOGENIC NEMATODES FOR DOMESTIC FOWLS.


*Abstract*

*An outbreak of capillariasis due to Capillaria perforans* Kotlán & Orosz, *1931, in a flock of guinea-fowls (Numida meleagris) in the State of São Paulo, Brazil, enabled the author to make a careful study of the above mentioned species of nematode, which had before only been reported once, as a parasite of the turkey (Meleagris gallopavo) in Hungary.*

*As the validity of Capillaria perforans has been questioned by some authors who prefer to consider this species as identical with C. contorta, the author has thoroughly compared the two species, and comes to the conclusion that they are really different.*

*Capillaria perforans is redescribed and the main differences between C. perforans and C. contorta are pointed out as follows:*

*a) the shape of the posterior end of the body of the male;*
*b) the size of the spicules (12-16-mm.) which the author has always been able to measure in C. perforans;*
*c) the total length of the body, which attains 150 mm. in the female and 60 mm. in the male specimens.*

*The pheasant (Phasianus colchicus) and the Abyssinian-fowl (Numida ptylorhyncha) have also been found to harbour C. perforans.*


BIBLIOGRAFIA


Cram, E. B. — 1936 — Species of Capillaria Parasitic in the Upper Digestive Tract of Birds. *Technical Buletin n.º 516,* U. S. Dept. Agr. Washington.

Freitas, J. F. Teixeira & Lins de Almeida, J. — 1935 — O genero «Capillaria» Zeder, 1800 («Nematoda-Trichuroidea») e as capillarioses nas aves domesticas. *Rev. Departamento Nacional de Producção Animal n.ºs 4, 5 e 6,* pp. 311-363.

Freitas, J. F. Teixeira & Lins de Almeida, J. — 1935 — Sobre os *Nematoda Capillariinae* parasitos de esophago e papo de aves. *Mem. Inst. Osw. Cruz,* **30**, f. 2, pp. 123-156.


Nota: Não podendo consultar a descrição original de *C. perforans,* valemonos da tradução ingleza completa, no trabalho de Miss Cram.

———o———

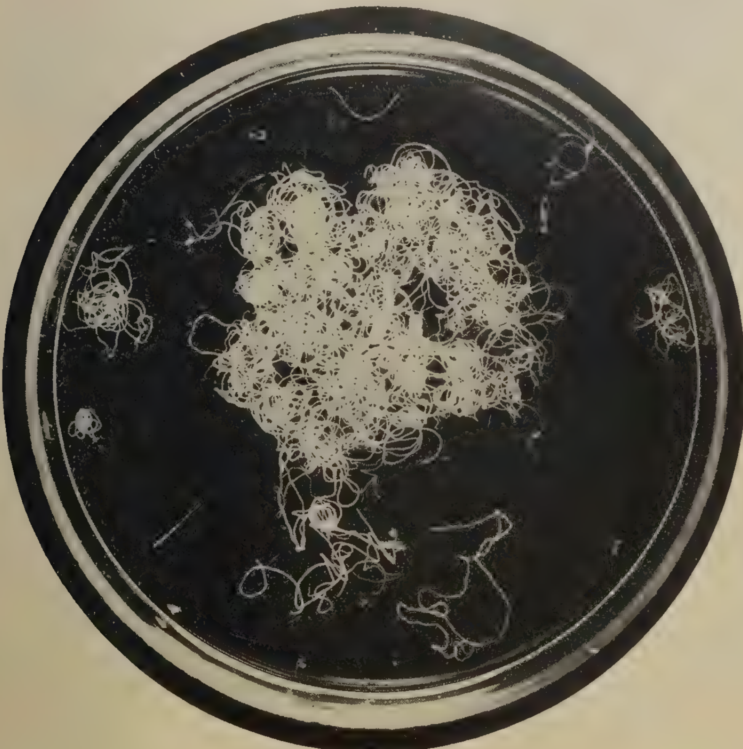


Fig. A - *Capillaria perforans* KOTLÁN & OROSZ, 1931. Grupo de exemplares, tamanho natural

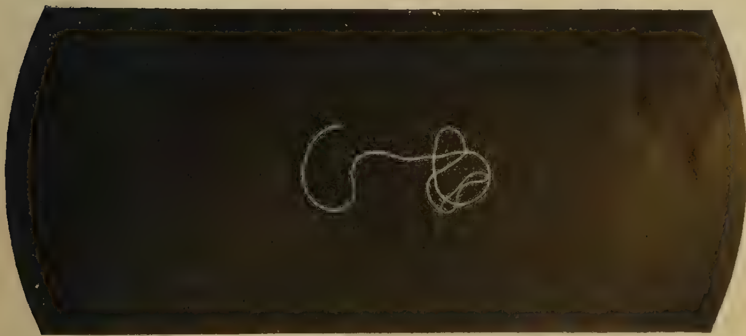


Fig. B - *Idem.* Um exemplar isolado, tamanho natural

Vol. 10 — Art. 6 Setembro de 1939

# FARMACOLOGIA DA TRIPSINA

## AÇÃO SOBRE MUSCULO LISO E CORAÇÃO ISOLADO DE MAMIFEROS. EFEITOS CIRCULATORIOS DA TRIPSINA.

### EXPERIENCIAS COM UMA PREPARAÇÃO CRISTALINA

POR

**M. Rocha e Silva**

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 29 figuras no texto e estampa 16

Em publicações recentes (1938 e 1939) mostramos os efeitos farmacologicos produzidos pela tripsina sobre a musculatura lisa do intestino e utero de cobaia, bem como a sua capacidade de libertar histamina do pulmão de cobaia perfundido com soluções do fermento. Nessa primeira série de experiencias empregámos um preparado comercial (Schering) purificado por diálise prolongada. As experiencias aqui referidas foram realizadas com uma preparação cristalina de tripsina e tiveram como objetivo verificar os resultados obtidos anteriormente e extendê-los tanto quanto possivel.

Impressionara-nos o fato de uma substancia da importancia biologica da tripsina, já obtida sob forma cristalina, nunca ter sido estudada do ponto de vista farmacologico. Todos os detalhes da sua ação como fermento proteolitico eram conhecidos e embora se soubesse que em certas condições patologicas o seu efeito destruidor se exerce sobre os tecidos vivos, o conhecimento das suas propriedades fármacodinamicas era praticamente inexistente.

Quasi todas as experiencias feitas com o objetivo de esclarecer a sua ação *in vivo,* se limitaram á verificação dos efeitos sobre os vasos sanguineos. Assim ACHALME (1901) descreveu uma dilatação local dos capilares acompanhada de diapedèse das hematias em consequencia da injeção subcutanea de um extrato pancreatico. ROSENBACH (1911) e MÜCK (1910) acompanharam ao microscopio a sucessão dos acontecimentos produzidos pela injeção de tripsina na lingua da rã. Observaram dilatação dos capilares, diapedèse das hematias e hemorragia por destruição dos capilares. Segundo esses autores a tripsina agiria por intermedio de um veneno vascular posto em liberdade pela destruição das proteinas tissulares.

Desde os primitivos trabalhos de GULEKE (1906), v. BERGMANN & GULEKE (1910), POLYA (1906) e tantos outros, a patogenia da pancreatite hemorragica aguda estaria em relação estreita com os efeitos toxicos produzidos pelo agente triptico secretado pelo pancreas.

BERGMANN (1906) e BAMBERG (1909) mostraram a toxidez de injeções intraperitoniais de tripsina. Nessas experiencias a dose mortal para cobaia, do preparado comercial (Grübler), era de 0,2 a 0,5 g. por quilo.

LOEPER & ESMONET (1908) descreveram perturbações graves: albuminuria, glicosuria, etc., depois da injeção de tripsina.

KIRCHHEIM (1914) e PFEIFFER (1922) admitiram, como sinal mais caracteristico do envenenamento pela tripsina, perturbações gerais na regulação térmica.

BOERNER-PATZELT (1923) descreve lesões graves produzidas no camondongo pela injeção subcutanea de um autolisato pancreatico. Particularmente as capsulas suprarenais e o sistema vascular eram atingidos pelo toxico.

Perturbações do metabolismo em virtude da injeção de tripsina, foram ainda descritas por BATELLI & STERN (1911).

Todas as experiencias citadas, entretanto, foram realizadas com material mais ou menos impuro, extratos de tecido pancreatico ou simples autolisatos do pancreas. A participação de substancias ativas contidas como impurezas nos preparados empregados poderia explicar muitas das ações toxicas atribuidas pelos autores citados á trypsina. Estas considerações levaram OPPENHEIMER (1926) a concluir: *Ein Gift im eigentlichen Sinne ist also Trypsin geradeso wenig wie andere Fermente.* E mais recentemente DRAGESTEDT & COLL. (1934) punham em duvida a capacidade da tripsina de produzir efeitos destrutivos sobre os tecidos vivos: *It is probable that trypsin has no corrosive properties in itself, which would injure living cells.*

A mesma objeção entretanto não póde ser feita aos autores seguintes, que utilizaram preparações muito puras, de tripsina.

RICH & DUFF (1936) mostraram a capacidade da tripsina de produzir lesões vasculares graves, tais como necroses e hemorragias, quando injetada subcutaneamente. As suas experiencias, realizadas com a preparação cristalina de KUNITZ & NORTHROP, mostraram a estreita semelhança entre os efeitos vasculares produzidos pela tripsina e os caracteristicos da pancreatite hemorragica aguda. Referindo-se áquelas lesões caracteristicas desta doença do pancreas, os autores citados dizem textualmente: *This vascular necrosis is the direct result of the action of pancreatic juice upon the walls of the vessels, and the agent in the juice responsible for the necrosis is the tryptic ferment.*

Mais recentemente FRIEDMANN & KATZ (1938) produziram uma insuficiencia renal pela injeção de tripsina na arteria renal em cães. Observaram ainda necroses e hemorragias no parenquima renal, depois de 48 horas da injeção do fermento.

As experiencias que referiremos a seguir, nas quais verificamos a capacidade da tripsina de produzir um colapso circulatorio no gato e no coelho, menos de um minuto depois da injeção na veia, se distinguem nitidamente de todas as experiencias citadas, nas quais se procurou sempre verificar um efeito tardio, depois de muitas horas e mesmo dias, da injeção do agente triptico.

Em publicação anterior (1938) salientámos a semelhança dos efeitos produzidos sobre a musculatura lisa de mamiferos pela tripsina e por certos venenos animais, como veneno de cobra, de escorpião e de abelhas, e por certas toxinas bacterianas como a toxina estafilococica. Ora, a existencia de agentes proteoliticos em tais venenos e toxinas é um fato bem estabelecido e conhecido de todos.

E' verdade que recentemente FELDBERG & KELLAWAY (1938) e FELDBERG, KELLAWAY & HOLDEN (1938) estabeleceram uma relação, aliás incompleta, entre os efeitos hemoliticos dos venenos de cobra e a sua capacidade de fazer contrair a musculatura lisa do utero de cobaia. Particularmente a propriedade de libertar histamina pela perfusão do pulmão de diversas especies animais, seria comum ao veneno de cobra e á lisocitina.

Ora, é tal a semelhança de efeitos produzidos pela tripsina e pelos venenos de cobra e toxinas bacterianas, que certamente a ação proteasica deles deve cooperar com outras substancias de natureza mais incerta, na produção dos efeitos farmacologicos observados.

## MATERIAL E METODOS

As experiencias aqui referidas foram realizadas com um material cristalino gentilmente cedido pelo Prof. JOHN NORTHROP, do Instituto Rockefeller de Princeton, e preparado com a técnica de extração descrita por KUNITZ & NORTHROP (1935).

O Tyrode utilizado nas experiencias seguintes, como liquido de perfusão do musculo liso e coração isolado, de mamifero, tinha a composição do Tyrode habitual, excetuando a natureza do sal de magnesio utilizado. Em ensaios preliminares verificámos que a substituição do $MgCl_2$ pelo $MgSO_4$ nenhum inconveniente trazia para a excitabilidade do musculo e para a sua vitalidade. A composição do Tyrode era a seguinte: NaCl 0,8 %, $CaCl_2$ 0,02 %, $MgSO_4$ anhidro 0,025 %, KCl 0,02 %, $NaH_2CO_3$ 0,02 %, $NaH_2PO_4$ 0,01 %, Glicose 0,1 %.

O preparado cristalino de tripsina foi-nos fornecido com um peso igual de $MgSO_4$ anhidro. A preparação da solução a testar era feita da seguinte maneira: 50 mg. do material (contendo 25 mg. de tripsina e 25 mg. de $MgSO_4$ anhidro) eram dissolvidos em 100 cc. de um liquido da mesma composição do Tyrode, não contendo entretanto o sal de Mg. Depois da adição do preparado obtinhamos uma solução de tripsina em Tyrode, em que a quantidade de sulfato de magnesio anhidro era a mesma do liquido de perfusão.

O aparelho utilizado, bem como o metodo de adição das soluções a testar ao banho de suspensão do musculo liso, foram os mesmos já descritos em publicação anterior. A obtenção do material vivo era feita como foi descrito anteriormente para cobaia. Em algumas das experiencias com utero de coelha em diestro e intestino de gato, mantinhamos o fragmento de orgão entre duas mechas de algodão, na geladeira, durante algumas horas e mesmo 1 dia.

Para testar a sensibilidade dos musculos lisos, uzamos geralmente o diclorhidrato de histamina (SCHUCHARDT). Na experiencia com o utero de coelha em diestro uzamos ainda soluções de adrenalina preparadas a partir da solução 1/1000 (PARKE-DAVIS).

Nas experiencias de perfusão do coração isolado, de mamifero, utilizámos uma modificação do dispositivo de LANGENDORFF. O debito da coronaria era medido com o dispositivo descrito por GUNN (1926). Geralmente determinavamos, em segundos, o tempo necessario para a passagem de 3,5 cc. de liquido de perfusão através dos vasos sanguineos.

Nas experiencias em que estudámos os efeitos circulatorios da tripsina, uzámos como anestésico o hedonal (Bayer) na dose de 0,5 g. por quilo de peso, em solução alcoolica e por via intramuscular, no coelho. Nas experiencias em gato utilizámos como anestésico a cloralose (Merck) na dose de 0,11 g. por quilo de peso, em solução no alcool e por via intramuscular.

A pressão na arteria pulmonar era tomada por uma cânula inserida num dos ramos laterais esquerdos. Para isso, depois de aberto o tórax e mantida uma respiração artificial de 9 a 10 inspirações por minuto, o lobo pulmonar esquerdo superior era retirado. Geralmente faziamos uma injeção previa de heparina na dose de 2 mg. por quilo.

Nestas experiencias empregámos quasi sempre uma tripsina desembaraçada do sal de magnesio por diálise prolongada contra uma solução n/100 de HCl. A passagem do ionio sulfato era testada no liquido exterior. Geralmente 4 dias eram suficientes para a retirada total do sal de Mg. Em seguida, a solução era dialisada contra liquido de Tyrode, durante 48 horas.

## RESULTADOS

### a) Ação da tripsina sobre o utero de cobaia

O utero de cobaia mostrou-se extremamente sensivel, reagindo com contração maxima, mesmo em seguida á adição de 1 γ de tripsina ao banho de 30 cc. de Tyrode. A dessensibilização do utero á tripsina, já descrito em publicação anterior, foi facilmente obtida com doses pequenas do fermento.

A fig. 1 mostra essa dessensibilização para doses progressivamente crescentes de tripsina. Em seguida a uma primeira contração produzida por 1 γ de tripsina, contração precedida de um tempo latente de cerca de 40 segundos, o musculo mostrou-se insensivel á mesma dose do fermento. Uma segunda contração só pôde ser obtida com a adição ao banho, de 60 γ do preparado cristalino. Uma terceira contração foi obtida com a adição ao banho, de 210 γ, seguindo-se a dessensibilização ainda para esta dose. Uma quarta contração foi obtida com 375 γ de tripsina, e uma quinta contração, com 1 mg. da enzima.

A fig. 2 mostra uma dessensibilização parcial obtida com doses mais ou menos consideraveis do fermento. Essa dessensibilização parcial, obtida com frequencia, sempre se traduziu por uma diminuição da intensidade da reação e um alongamento consideravel do tempo de latencia. Em alguns casos esse alongamento do tempo de latencia foi consideravel, passando de alguns segundos antes das primeiras contrações, para 4 a 5 minutos, depois de varias adições da mesma dose do fermento.

A dessensibilização total, como se observa na fig. 1, só é obtida com doses muito pequenas de tripsina. Frequentemente, depois de dessensibilizado para uma certa dose, o musculo volta a reagir depois de duas ou tres contrações com doses mais consideraveis. A figura 3

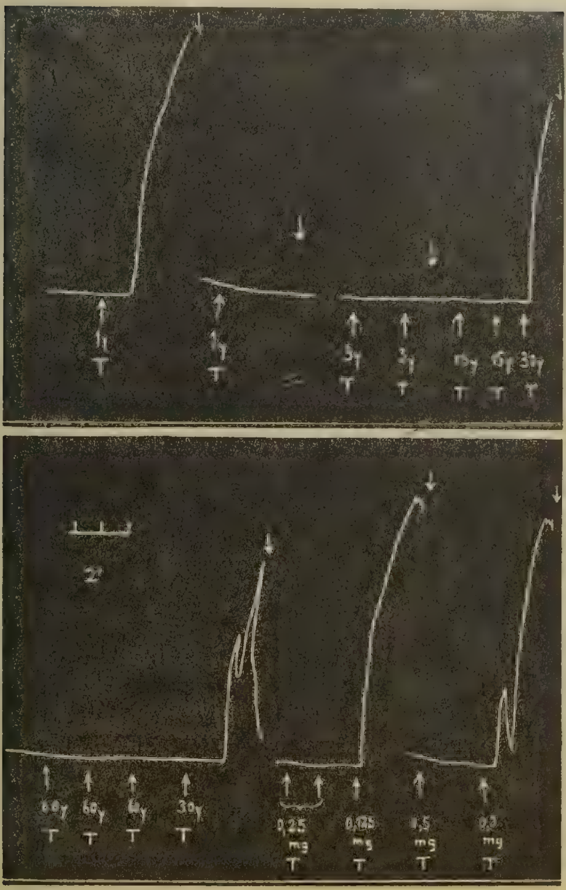


Fig. 1 - Utero de cobaia. Notar dessensibilização para doses crescentes de tripsina. (As setas superiores indicam sempre substituição do Tyrode da cuba).

mostra justamente esse fenomeno. Depois de duas contrações com uma dose forte de tripsina o musculo volta a reagir com uma quantidade menor de fermento, para a qual se tinha mostrado dessensibilizado anteriormente.

b) Ação sobre o intestino de cobaia

Com a preparação cristalina de tripsina pudemos confirmar todos os fatos, anteriormente descritos por nós e obtidos com um preparado Schering. Em seguida á adição do fermento ao banho de Tyrode,

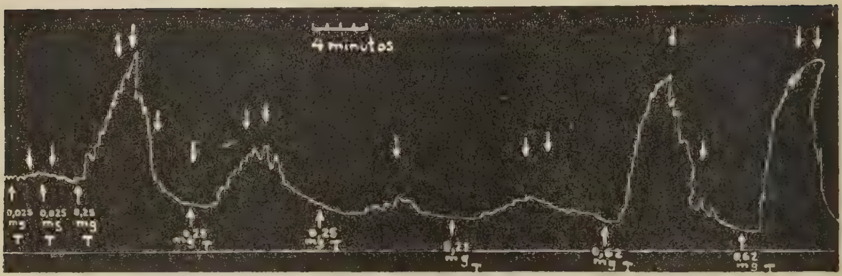



Fig. 2 - Utero de cobaia. Dessensibilização parcial á tripsina. Notar o aumento do tempo latente e diminuição da intensidade da reação.

observa-se uma elevação consideravel do tonus, precedida de um tempo latente maior ou menor. Superpondo-se a esse tonus elevado, observam-se contrações rapidas semelhantes ás produzidas por doses pequenas de histamina. Substituições sucessivas do liquido de perfusão são sem efeito na manutenção daquele tonus elevado. Só muito lentamente o musculo recupera o seu tonus primitivo.

A fig. 4 mostra os efeitos produzidos por duas adições de doses relativamente fortes de tripsina cristalizada ao banho de Tyrode.

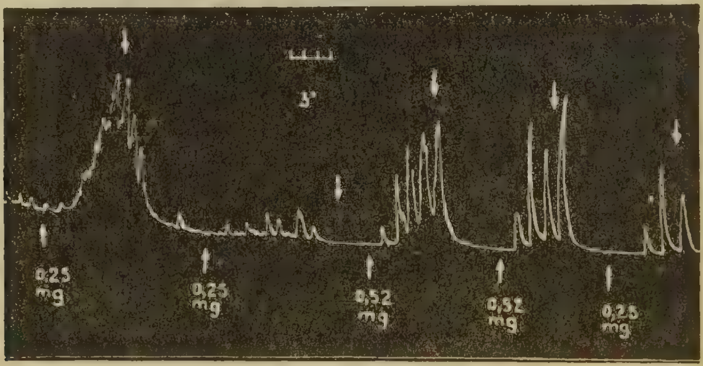



Fig. 3 - Utero da cobaia. Depois de duas contrações com 0,52 mg. de tripsina o musculo volta a reagir com 0,25 mg.

A fig. 5 mostra os efeitos produzidos por 5 adições do fermento ao banho de Tyrode. Póde-se ver que a sensibilidade do musculo á histamina permanece intacta, mesmo depois da ação de cinco doses de tripsina.

A dessensibilização do intestino de cobaia á tripsina foi já descrita em publicação anterior. A fig. 6 mostra que uma dessensibilização com o preparado cristalino póde ser obtida.

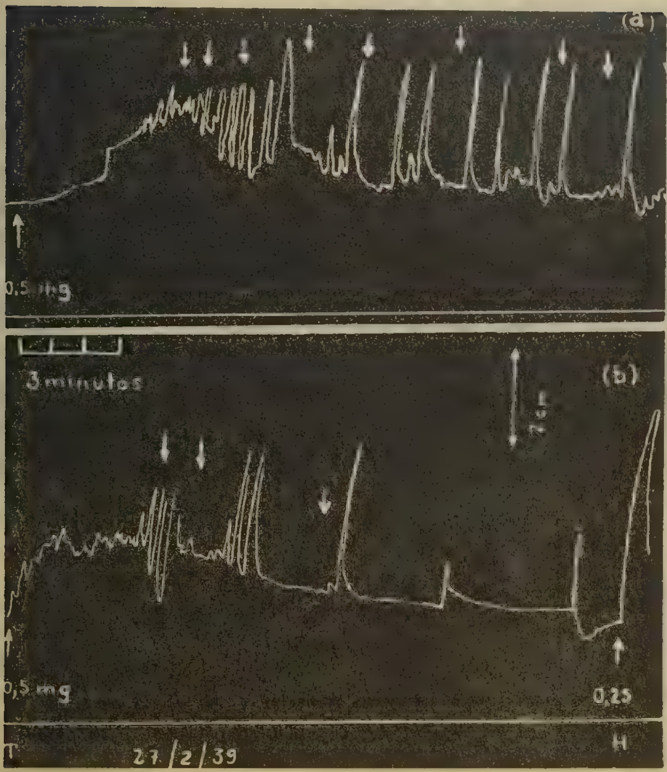



Fig. 4 - Intestino de cobaia. Efeito de duas adições sucessivas de 0,5 mg. de tripsina cristalizada ao banho de 30 cc. de Tyrode.

Póde-se ver uma nitida dessensibilização, embora incompleta, depois de quatro adições de 0,1 mg. de tripsina. Uma nova adição de 0,5 mg. do preparado cristalino produziu uma nova contração tonica resistente a sucessivas lavagens com novo Tyrode.

### c) Ação sobre o intestino de coelho

O intestino de coelho mostrou-se menos sensivel á ação da tripsina, que os musculos lisos anteriormente estudados. A dessensibilização total foi obtida com grande facilidade, mesmo com doses consideraveis do fermento. De 8 intestinos de coelho testados, um era completamente refratario á adição de doses fortes do fermento. Os outros reagiram sempre de maneira nitida com uma preparação comercial

(Schuchardt) dialisada demoradamente e com o preparado cristalino, segundo KUNITZ & NORTHROP.

A fig. 7 mostra uma experiencia tipica, realizada com a preparação cristalina. Póde-se ver uma dessensibilização total e nitida primeiro para 0,50 mg., depois para 0,75 mg. A adição da primeira dose

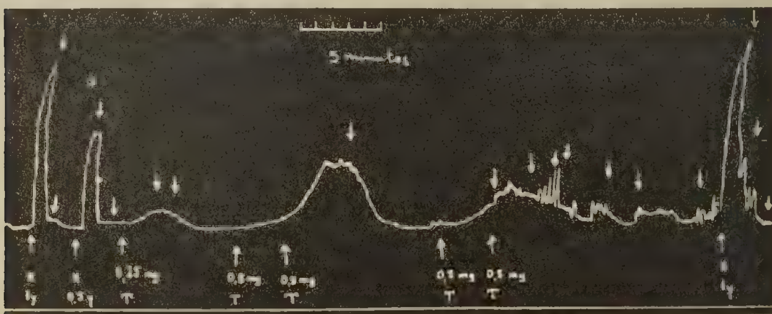


Fig. 5 - Intestino de cobaia. A sensibilidade a uma mesma dose (1 γ) de histamina permanece a mesma antes e depois da ação da tripsina.

produziu uma nitida contração precedida de um tempo de latencia de 1 minuto aproximadamente. Uma segunda contração foi obtida com a adição de 0,75 mg., depois de um tempo de latencia visivelmente prolongado. Uma terceira contração só pôde ser obtida depois de longo tempo de latencia, com a adição de 1 mg. de tripsina. A sensibilidade do musculo á histamina foi testada na secção (f).

### d) AÇÃO SOBRE O UTERO DE COELHA EM DIESTRO

O utero de coelha em diestro mostrou-se muito resistente á ação da tripsina. Doses consideraveis do fermento frequentemente nenhuma reação produziam no musculo. Particularmente os fragmentos de utero mantidos de um dia para o outro na geladeira, entre duas mechas de algodão embebidas em Tyrode (Segundo BURN) eram praticamente insensiveis á ação da enzima. Numa das experiencias em que utilizámos um corno uterino mantido 24 horas na geladeira, o orgão se mostrou insensivel a 4 mg. do preparado cristalino, mesmo mantidos em contato com o musculo durante mais de 30 minutos. Apenas algumas ligeiras ondulações do traçado foram observadas, embora o musculo reagisse nitidamente á adrenalina (Fig. 8).

Essa experiencia mostra de maneira muito nitida que os efeitos excitantes da tripsina não provém de uma possivel ação inespecifica produzida pela destruição da fibra muscular. O utero da experiencia

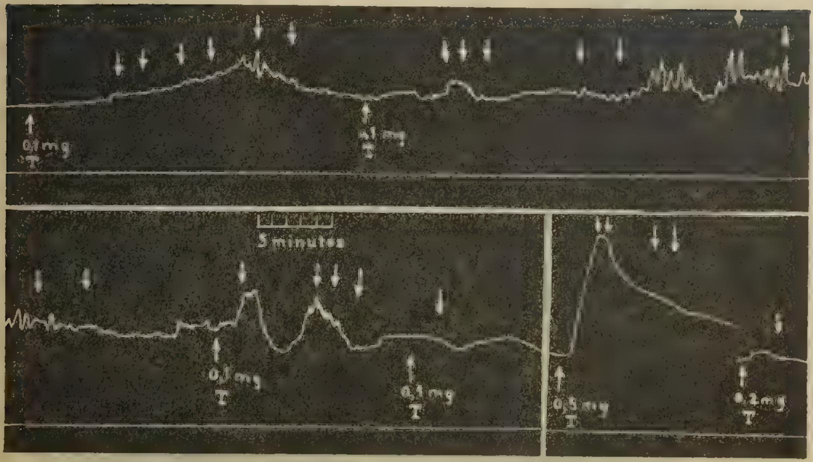



Fig. 6 - Intestino de cobaia. Notar dessensibilização depois de 4 adições de tripsina ao banho de 30 cc. de Tyrode. Uma dose cinco vezes mais forte produziu nova contração do musculo.

da fig. 8, foi mantido em contato com doses fortes da enzima purificada, durante tempo muito longo. Uma ação deleteria do fermento teria sido suficientemente forte para produzir efeitos bastante nitidos. Entretanto o musculo nenhuma reação apreciavel apresentou.

A experiencia inversa é a da fig. 1, em que dose minima do fermento (1 γ de tripsina em 30 cc. de Tyrode), produziu uma contração maxima do utero de cobaia. Ora, na experiencia da fig. 1, nenhum efeito deleterio poderia ter sido produzido com doses tão pequenas do fermento (concentração no banho de 1/30 milhões); e entretanto, ao fim de 40 segundos o musculo se contraíu fortemente.

Em resumo, as duas experiencias mostram que é possivel dissociar o efeito destruidor da tripsina do seu efeito farmacologico.

As duas experiencias ilustradas nas figuras 9 e 10 foram realizadas nas seguintes condições: dois cornos uterinos de uma coelha em diestro foram separados imediatamente após a morte do animal. Um deles, o da fig. 9 foi experimentado logo em seguida, e o outro (fig. 10) foi testado depois de um estagio de 20 horas na geladeira. A experiencia mostra que a sensibilidade do utero de coelha á tripsina corre paralela com a sua sensibilidade á histamina, e de nenhum modo, com a sua sensibilidade á adrenalina, o que vale dizer, ao seu excitante fisiologico. Póde-se ver (fig. 9) que o primeiro corno uterino mostrou forte sensibilidade á adrenalina (0,5 γ) e fraca sensibilidade á his-

tamina (contração pequena com 0,6 mg.) e fraca sensibilidade á tripsina (duas contrações com 0,25 mg. de tripsina e dessensibilização mesmo para 0,75 mg.). O segundo corno uterino (fig. 10) mostrou sensibilidade ainda muito grande para a adrenalina (contração apreciavel com 5 γ) e insensibilidade completa mesmo a 3 mg. de tripsina.

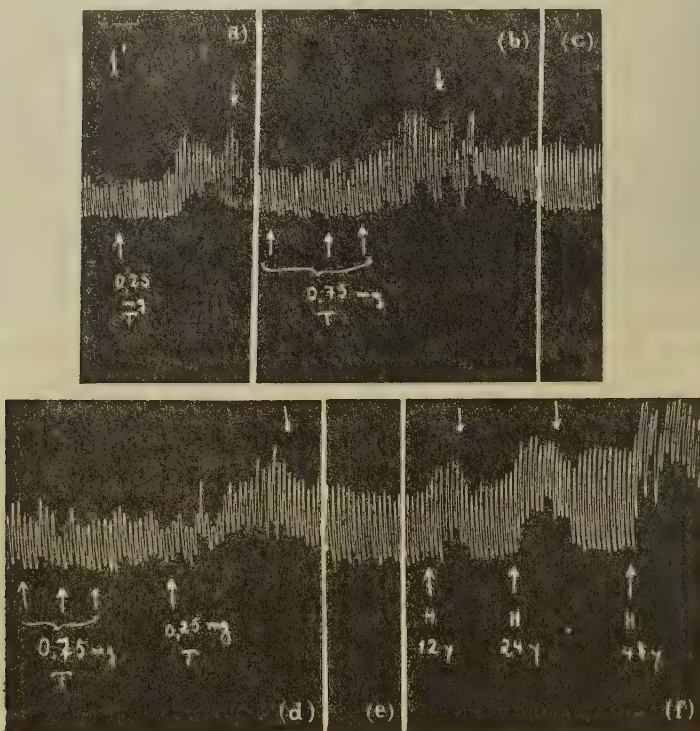


Fig. 7 - Intestino de coelho. Notar dessensibilização primeiro para 0,50 mg. de tripsina depois para 0,75 mg. H = diclorhidrato de histamina.

Estas experiencias mostram que o efeito da tripsina não deve decorrer de uma excitação das terminações nervosas motoras (simpaticas) do utero da coelha.

e) Ação sobre o intestino de gato. Influencia da atropinização

Doses pequenas da preparação cristalina produziram sempre uma contração forte do musculo liso do intestino do gato. Este mostrou-se quasi tão sensivel á tripsina quanto o intestino de cobaia. A fig. 11, mostra tres contrações de um fragmento de intestino de gato, produ-

zidas em seguida á adição ao banho de Tyrode de 0,12 mg. de tripsina. Na mesma figura a sensibilidade do musculo foi testada em relação á histamina.

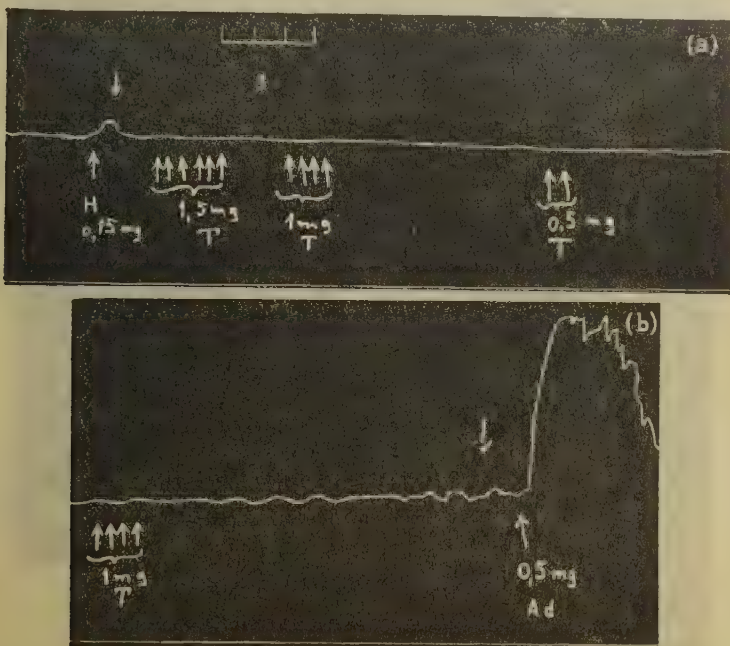



Fig. 8 - Utero de coelha em diestro, mantido 24 horas na geladeira. Explicação no texto.

A dessensibilização do musculo foi aqui quasi tão dificil quanto a obtida com o intestino de cobaia. Com as doses empregadas, de 0,02 a 0,62 milig. do preparado cristalino, pudemos observar apenas dessensibilizações parciais que se traduziram por um aumento do tempo de latencia e diminuição da intensidade da reação. A fig. 12, mostra uma dessensibilização incompleta para 0,02 mg. de tripsina.

Na experiencia da fig. 13, procuramos verificar o efeito da atropinização do musculo do intestino do gato na reação produzida pela tripsina. Póde-se ver que mesmo depois da adição de 0,6 mg. de atropina ao banho de 30 cc. de Tyrode, nenhuma ação pôde ser observada sobre a intensidade da reação produzida por 0,12 mg. de tripsina, da mesma forma que nenhum efeito pôde ser observado pela adição de 0,4 mg. de atropina, na reação produzida por 30 $\gamma$ de histamina.

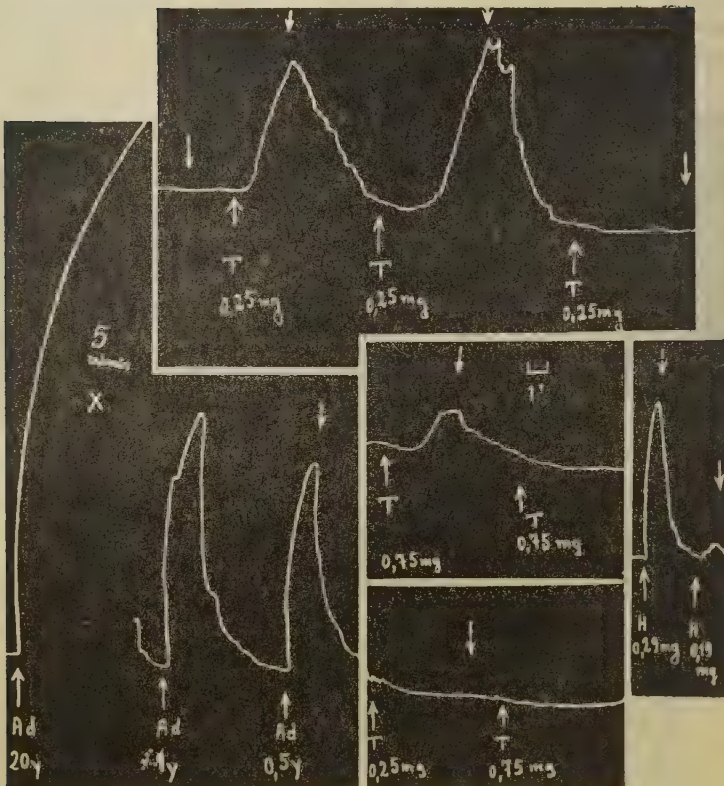


Fig. 9 - Utero de coelha em diestro. Reação á adrenalina, tripsina e histamina.

Esta ultima experiencia permite afastar de maneira definitiva a possibilidade de se explicar a ação da tripsina sobre o musculo liso do intestino do gato pela mediação de colina ou acetilcolina, porquanto o efeito de tais drogas, não resiste á atropinização do musculo.

#### f) Ação sobre o jejuno de rato e o jejuno de camondongo

A fig. 14 mostra os efeitos produzidos pela tripsina e pela histamina sobre o jejuno de rato. Póde-se ver num e noutro caso uma rapida elevação do tonus com aumento nitido e progressivo da amplitude das contrações. Póde-se ver na mesma figura uma dessensibilização nitida mas não total do mesmo fragmento de intestino de rato, para uma dose de 0,25 mg. de tripsina.

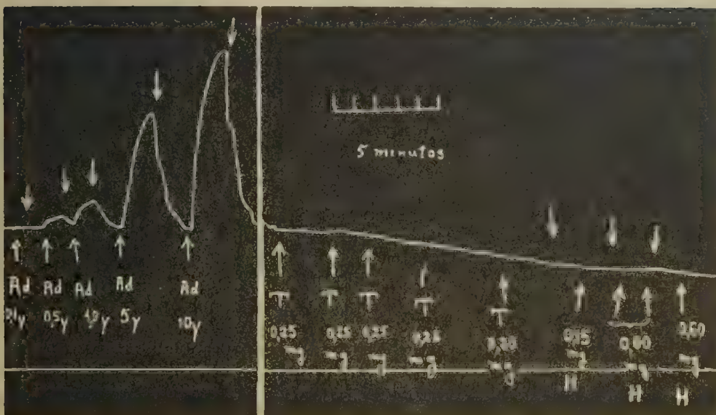



Fig. 10 - Outro corno do mesmo animal da figura 9. Insensibilidade á histamina e á tripsina.

Na figura 15 está representada uma experiencia realizada com o intestino de camondongo. Póde-se ver que o musculo é praticamente refratario á ação da histamina e da tripsina.

h) Ação sobre o utero de rata virgem.

Observámos um efeito tonico nitido da tripsina sobre o utero da rata virgem. A fig. 16 ilustra uma das experiencias. Póde-se ainda ver aí o efeito caracteristico da histamina (relaxante) sobre o utero da rata virgem. A atropinização do musculo foi igualmente sem efeito sobre a ação tonica da tripsina (Fig. 16-*b*).

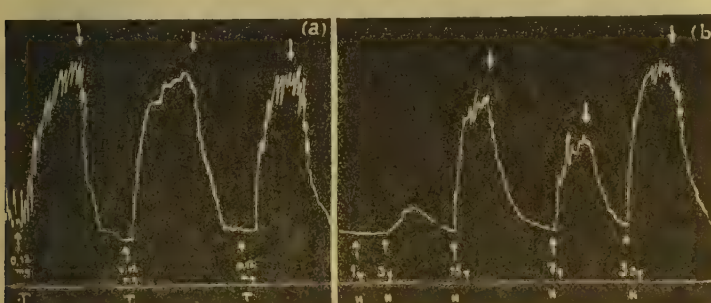



Fig. 11 - Intestino de gato. Efeito de tres adições ao banho de Tyrode de 0,12 mg. de tripsina cristalina. H = Diclorhidrato de histamina.

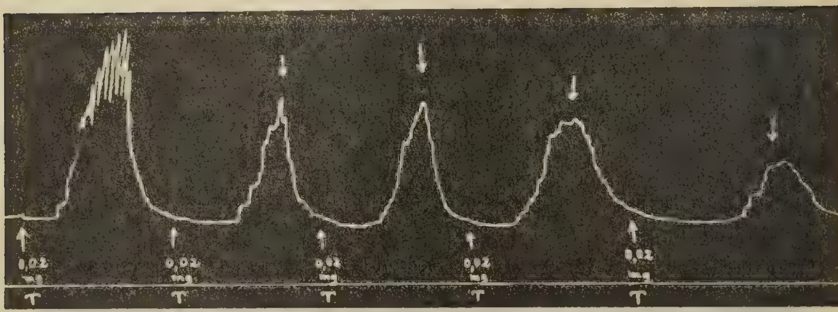


Fig. 12 - Intestino de gato. Dessensibilização parcial para 0,02 mg. de tripsina.

A idéa de que a histamina, neste caso, seja o mediador da ação da tripsina só dificilmente poderia ser aceita. Das substancias ativas conhecidas, apenas a colina e a acetilcolina são capazes de produzir uma contração do utero da rata virgem, sendo a sua ação entretanto completamente inhibida pela atropina. Ora, acabamos de ver que a atropinização nenhum efeito inhibidor exerce sobre a ação da tripsina. A hipótese da mediação de uma substancia ainda desconhecida será discutida mais adiante.

### h) Da natureza do mediador da ação da tripsina sobre o musculo liso

Em publicações anteriores fomos levados a admitir a hipotese de que a ação da tripsina sobre a musculatura lisa do intestino e utero

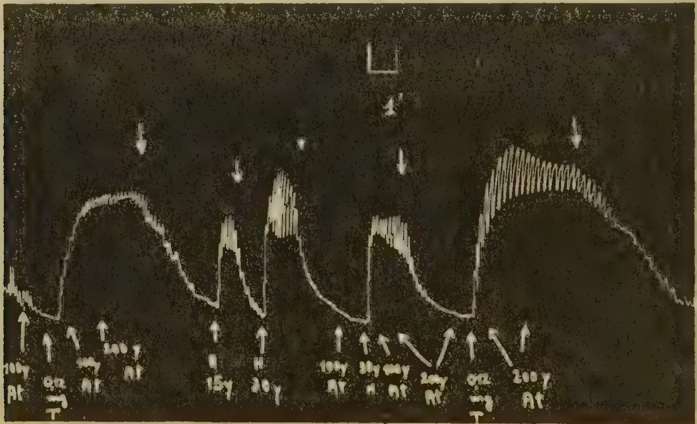


Fig. 13 - Intestino de gato. A atropinização não inhibe a ação de 0,12 mg. de tripsina.

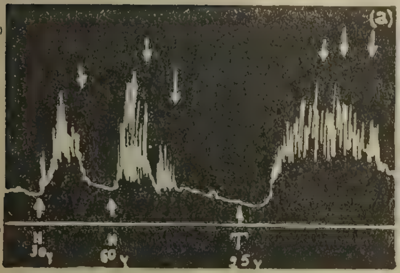


Fig. 14-*a*. Intestino de rato. Ação da histamina e da tripsina. Notar excitação dos movimentos espontaneos.

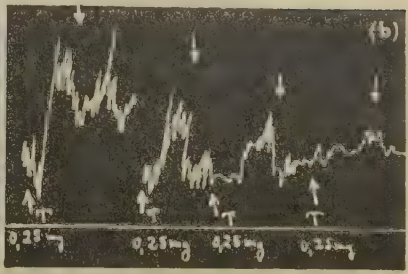


Fig. 14-*b*. Mesmo intestino de rato. Notar dessensibilização quasi total a 0,25 mg. de tripsina.

de mamiferos seja indireta, pela libertação de um mediador quimico. As experiencias seguintes reforçam a suposição de que, pelo menos no tocante á ação da tripsina sobre o utero e intestino de cobaia, a histamina seja o mediador dessa ação.

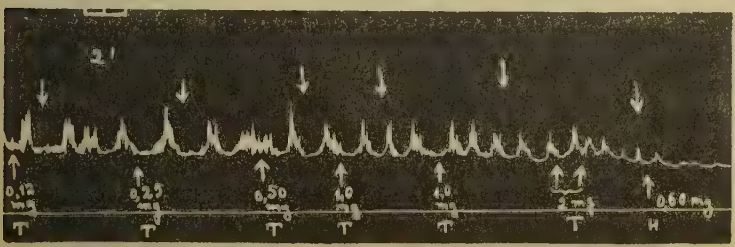


**Fig. 15 - Intestino de camondongo. Insensibilidade á histamina e a tripsina.**

E' sabido (Barsoum & Gaddum, 1935) que a adição de uma dose forte de histamina determina o aparecimento de um estado refratario do musculo liso á propria histamina, isto é, a adição de uma nova dose pequena de histamina nenhum efeito excitante produz.

A fig. 17, mostra que um fragmento de utero de cobaia virgem, previamente tratado, durante 15 minutos, com 60 $\gamma$ de histamina, ao mesmo tempo que se torna refratario a 2 $\gamma$ de histamina, reage mal a 0,75 mg. de tripsina cristalina. Depois de um tempo de espera de 15 minutos, durante o qual o Tyrode foi repetidamente substituido, o musculo reagiu com uma contração maxima pela adição de 0,50 mg. da mesma preparação de tripsina.

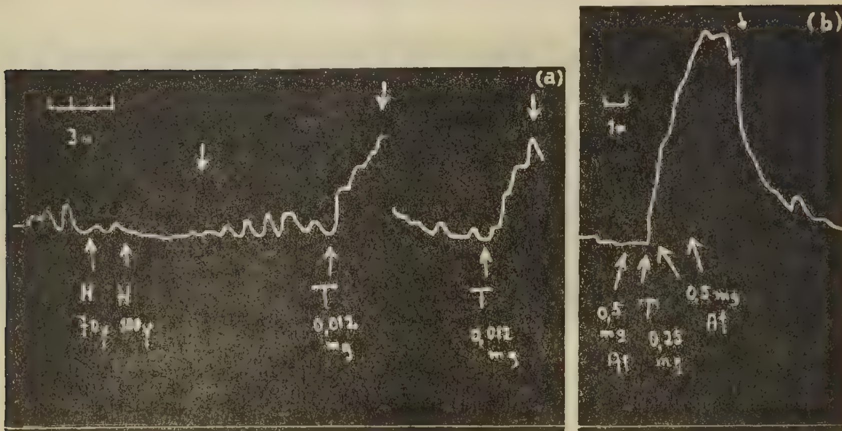



Fig. 16 - Utero de rata virgem. (a) Efeito da histamina (relaxante) e da tripsina (excitante). (b) A atropinização do musculo é sem efeito sobre a ação da tripsina.

O segundo fato que corrobora a idéa de uma mediação histaminica é o representado pela fig. 18. Póde-se ver aí uma elevação consideravel do tonus de um fragmento de intestino de cobaia, produzida

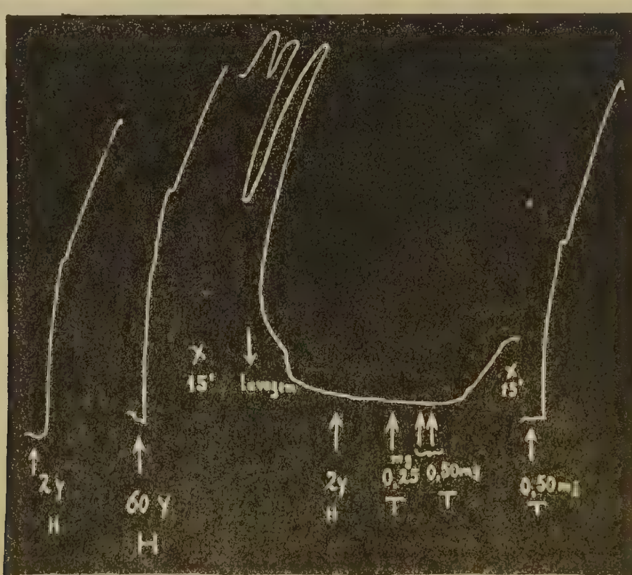



Fig. 17 - Utero de cobaia virgem. O utero envenenado pela ação prolongada de 60 γ de histamina, deixa de reagir a 2 γ de histamina e reage mal a 0,75 mg. de tripsina. (Os sinais x, na fig., indicam parada do cilindro durante 15 minutos).

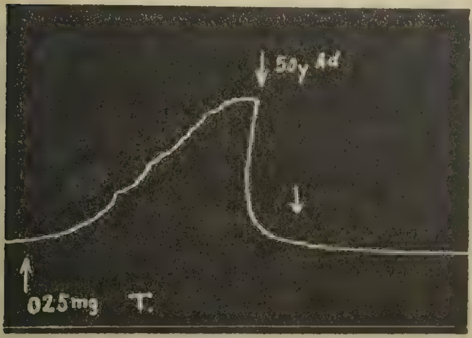



Fig. 18 - Intestino de cobaia. A adição de 50 γ de adrenalina produziu uma quéda rapida do tonus, augmentado pela ação de 0,25 mg. de tripsina.

pela adição ao banho de Tyrode, de 0,25 mg. de tripsina. A adição de 50 γ de adrenalina determinou uma volta repentina do tonus ao valor inicial. Ora, a capacidade das substancias simpaticomiméticas de inhibir a ação da histamina sobre o intestino isolado de cobaia foi recentemente demonstrada por UNGAR & COLL. (1937).

E' evidente que esses factos não demonstram que o mediador seja a histamina. Apenas contribuem para reforçar a hipotese da mediação histaminica. Com efeito, ainda não se demonstrou que a fase refrataria que sucede ao envenenamento do musculo liso pela histamina seja especifica para esta substancia, como ainda não se demonstrou que seja especifico para a histamina o efeito inhibidor das substancias simpaticomiméticas. Justamente a ignorancia de um reativo que inhiba ou reforce especificamente a ação da histamina tornou sempre dificil em casos similares (veneno de cobra, choque anafilático em orgãos isolados) comprovar de maneira insofismavel uma mediação histaminica.

i) AÇÃO SOBRE O CORAÇÃO ISOLADO, DE MAMIFEROS (COELHO E COBAIA)

Os efeitos da tripsina sobre o coração isolado, de mamifero, pareceram-nos muito complexos. Fizemos experiencias com 10 cobaias, o que nos permitiu ter uma idéa nitida dos efeitos do fermento sobre o orgão.

A complexidade dos efeitos observados deve provir das condições de perfusão, muito diferentes das de perfusão do musculo liso. No caso do coração, o fermento injetado na cânula aortica é levado a cada um dos componentes do orgão, ao passo que no caso de perfusão do musculo liso o fermento age apenas sobre a camada externa do orgão.

Coração de cobaia: Doses pequenas do fermento produziram ligeiros mas nitidos inotropismo e cronotropismo positivos. Do-

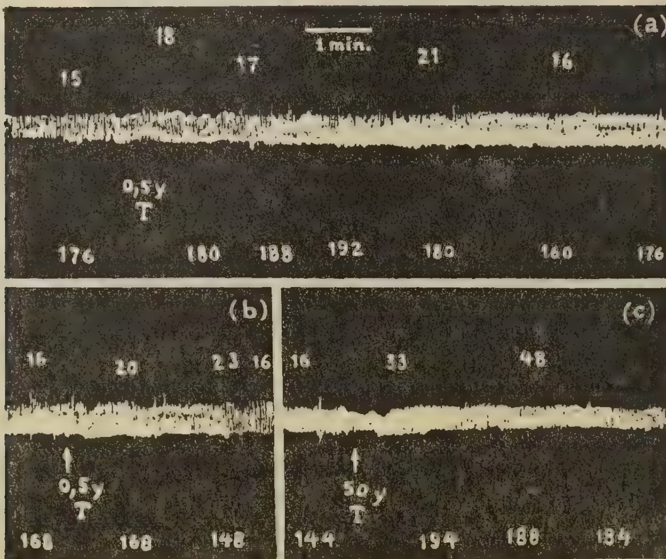



Fig. 19 - Coração isolado de cobaia. (Os numeros inferiores indicam o numero de batimentos por minuto).

ses fortes produziram ao contrario diminuição nitida do numero de batimentos por minuto e inotropismo negativo, ás vezes muito forte, conduzindo mesmo á parada do coração em meia contração. (Figs. 19

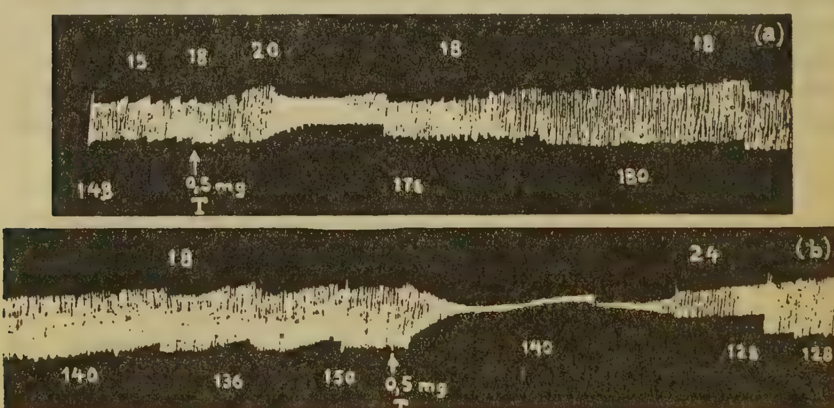



Fig. 20 — Coração isolado de cobaia. Depois da primeira injeção de 0,5 mg. de tripsina, póde-se ver um nitido efeito inotropo negativo, seguido de aceleração do ritmo cardiaco. Depois da segunda injeção, efeitos inotropo e cronotropo negativos.

e 20). Algumas irregularidades puderam ser observadas entretanto. Depois da injeção de uma dose relativamente forte e consequente diminuição da amplitude das contrações, uma subita aceleração que demorou alguns minutos (Fig. 20) pôde ser observada.

O efeito sobre as coronarias foi mais regular. Já doses pequenas de tripsina produziram uma diminuição nitida do volume do liquido de perfusão. (Nas figuras, o fluxo da coronaria está representado acima da faixa dos batimentos cardiacos. O numero aí representado indica, em segundos, o tempo necessario para a passagem de 3,5 cc. de liquido através dos vasos cardiacos.)

Coração de coelho: Na estampa 16 pódem-se ver com muita nitidez efeitos inotropo e cronotropo positivos, em seguida á injeção de pequenas doses de tripsina na cânula aortica. Doses mais fortes do fermento produziram uma parada do coração em meia contração. Nenhuma recuperação pôde ser observada, ao contrario do que póde ser visto na figura 20, com o coração de cobaia.

Um espasmo das coronarias tambem foi observado com o coração de coelho, em seguida á injeção, mesmo de pequenas doses do fermento.

### j) Efeitos circulatorios produzidos pela tripsina no gato e no coelho

Efeitos circulatorios no gato: pressão na carotida e na arteria pulmonar. As experiencias referidas adiante foram realizadas com a preparação cristalina segundo Kunitz &

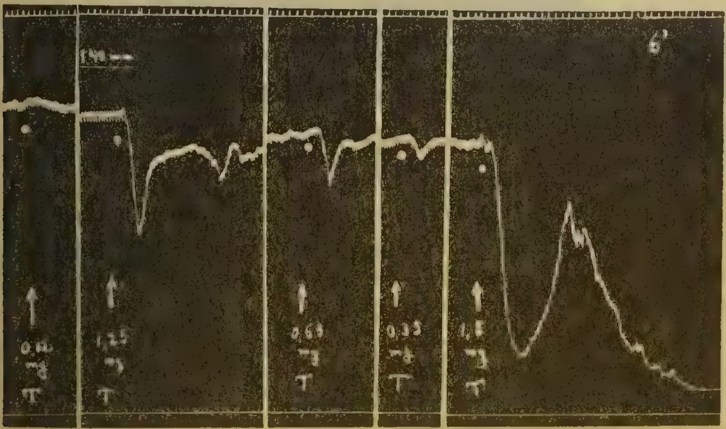


Fig. 21 - Pressão carotidiana no gato (3,1 kg.). Doses de tripsina compreendidas entre 0,35 mg. e 1,25 mg. produziram queda da pressão com recobro rapido. A injeção de 1,8 mg. produziu colapso mortal

NORTHROP. Como as doses a empregar em volume pequeno de Tyrode eram relativamente grandes, fomos obrigados a desembaraçar o material a injetar, do sulfato de magnesio anhidro. Com esse fim seguimos as indicações gentilmente enviadas pelo Prof. NORTHROP. Uma solução contendo 100 mgs. de preparado cristalino, em 20 cc. de agua distilada, era dialisada contra 200 cc. de uma solução N/100 de HCl. Esta ultima era substituida diariamente até ausencia completa do ionio sulfato, o que se verificava depois de 3 a 4 dias de dialise na geladeira.

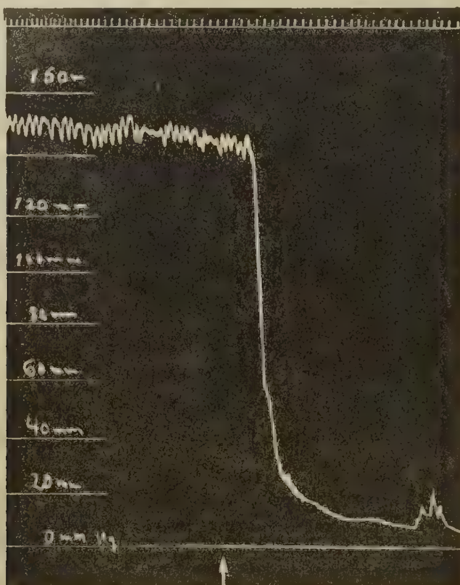



Fig. 22 - Colapso produzido por 3 mg. de tripsina cristalina, dialisada (livre de $MgSO_4$).

A fig. 21 mostra o efeito depressor nitido obtido num gato de 3,1 kg. pela injeção de doses compreendidas entre 0,35 e 1,8 mg. de tripsina. Doses compreendidas entre 0,35 mg. e 1,25 mg. produziram apenas uma queda brusca e evanescente da pressão sanguinea. A injeção de 1,8 mg. produziu uma queda mortal da pressão com uma tentativa de recobro. Pudemos observar neste e nos casos seguintes uma sincope respiratoria, acompanhando a sincope circulatoria mortal.

A figura 22 mostra uma quéda subita e mortal da pressão sanguinea em seguida á injeção de 3 mg. de tripsina em um gato de 2 kgs. de peso.

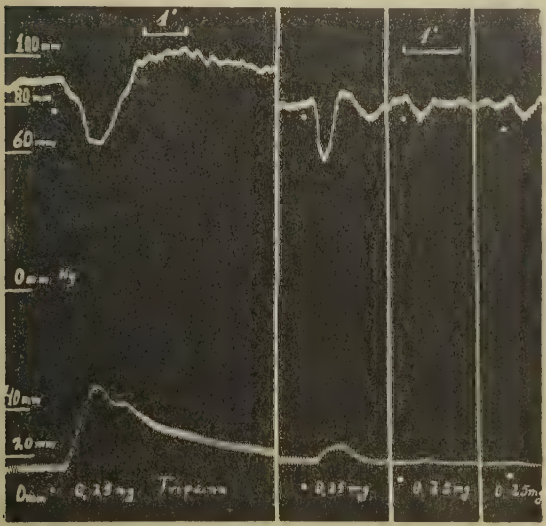


Fig. 23 - Traçado superior: pressão carotidiana. Traçado inferior: pressão na arteria pulmonar. Notar dessensibilização á dose de 0,25 mg. de tripsina.

A autopsia dos gatos que receberam doses mortais do fermento revelou invariavelmente uma dilatação consideravel do ventriculo e auricula direitos. Ao contrario, o ventriculo esquerdo mostrava-se sempre vazio, com algumas gotas de sangue. Essa estase no coração direito fez-nos suspeitar de um espasmo dos vasos pulmonares como causa do choque produzido pela tripsina.

A experiencia seguinte foi realizada em gato de 2,5 kgs,, com o torax aberto e sob respiração artificial. Uma cânula inserida num dos ramos da arteria pulmonar permitiu-nos obter um traçado da pressão sanguinea na pequena circulação. A fig. 23 mostra-nos o nitido aumento de pressão na arteria pulmonar coincidindo com a queda brusca da pressão carotidiana. Quatro injeções da mesma dose de tripsina (0,25 mg.) produziram uma dessensibilização nitida não sómente na pressão da arteria pulmonar como tambem na pressão carotidiana. A fig. 24 é a continuação do traçado obtido do mesmo gato. Póde-se ver que uma injeção de 1 mg. de tripsina produziu efeitos muito nitidos e demorados sobre a pressão da pulmonar e da carotida. Uma ultima injeção de 4 mg. do fermento determinou um colapso mortal. Póde-se ver que concomitantemente se produziu consideravel elevação da pressão na pulmonar.

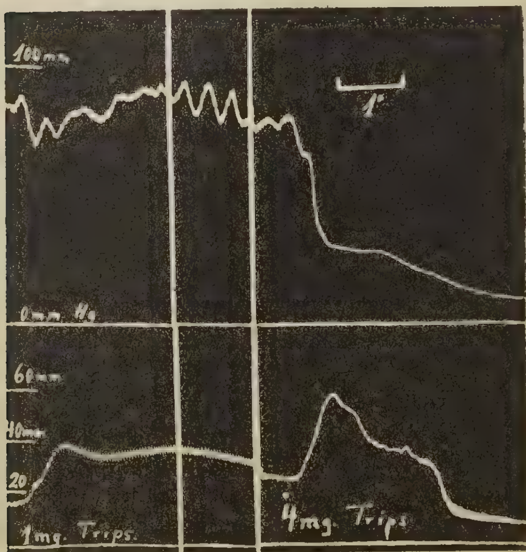



Fig. 24 - Continuação do traçado da figura 23. Depois de dessensibilização para 0,25 mg. de tripsina, a pressão na pulmonar se elevou nitidamente pela injeção de 1 mg. A injeção de 4 mg. de tripsina produziu colapso mortal.

Esta ultima experiencia realizada sob respiração artificial, mostra que o colapso respiratorio observado nas experiencias anteriores de modo nenhum póde ser considerado como a causa da morte.

O mecanismo do choque desencadeado no gato pela injeção de tripsina tem assim forte analogia com os choques produzidos pelo

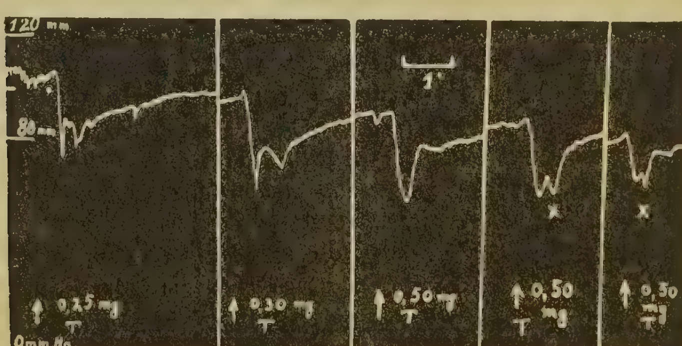



Fig. 25 - Pressão carotidiana no coelho. Explicação no texto.

veneno de cobra (FELDBERG & KELLAWAY, 1937 e 1938) e com o choque anafilatico (MANWARING, 1910 e DRINKER & BRONFENBRENNER, 1924). Nos tres casos citados, um forte espasmo vascular na pequena circulação parece ser a causa mais importante da queda da pressão carotidiana. Essa é uma propriedade farmacologica tambem apresentada pela histamina (DALE & LAIDLAW, *apud* GADDUM, 1936).

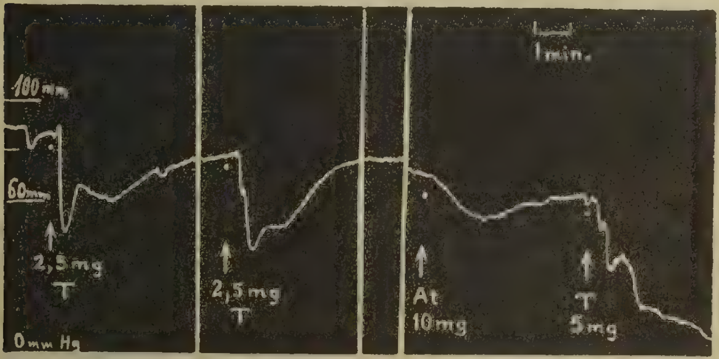



Fig. 26 - Pressão carotidiana no coelho. Tripsina cristalina, livre de sulfato de magnesio. 2,5 mgs. determinam quédas evanescentes da pressão arterial. Finalmente 5 mg. determinou uma quéda mortal da pressão. A injeção de 10 mg. de atropina não impediu este efeito.

A injeção de tripsina no coelho determinou tambem um efeito hipotensor nitido. A fig. 25 mostra o efeito produzido num coelho de 1,25 kg. de peso, pela injeção de doses pequenas do preparado cristalino de tripsina.

Injeções de doses compreendidas entre 0,25 mg. e 0,50 mg. produziram quédas mais ou menos sustentadas da pressão carotidiana. Uma dessensibilização parcial póde aqui ser igualmente observada. As ultimas injeções de 0,50 mg. de tripsina determinaram quédas sensivelmente menores que as produzidas inicialmente por 0,25 mg. da mesma preparação.

A experiencia ilustrada pela fig. 26 foi realizada com o preparado cristalino livre de sulfato de magnesio. Pódem-se ver duas quédas bruscas com recobro lento e incompleto, em seguida á injeção de 2,5 mgs. de tripsina num coelho de 1,7 kg. de peso. Finalmente a injeção de 5 mgs. de tripsina determinou uma quéda mortal da pressão mesmo depois da injeção de 10 mgs. de atropina.

A autopsia dos coelhos agudamente mortos pela injeção de tripsina mostrou uma estase nitida no coração direito e tronco da arteria pulmonar. O coração esquerdo, ao contrario, mostrava-se vasio. Esse fato, em tudo semelhante ao que observamos no gato, levou-nos a pesquisar tambem no coelho as variações da pressão da arteria pulmonar em consequencia da injeção de tripsina.

A fig. 27 mostra uma experiencia tipica. O traçado superior representa a pressão na carotida e o traçado inferior a pressão na arteria pulmonar. Póde-se ver que ao mesmo tempo que a pressão carotidiana desce, em seguida á injeção de 2 mgs. de tripsina, a pressão na arteria pulmonar se eleva de maneira nitida. As secções (d), (e) e (f) representam o recobro lento e em sentido inverso, das pressões, nos dois segmentos do aparelho circulatorio.

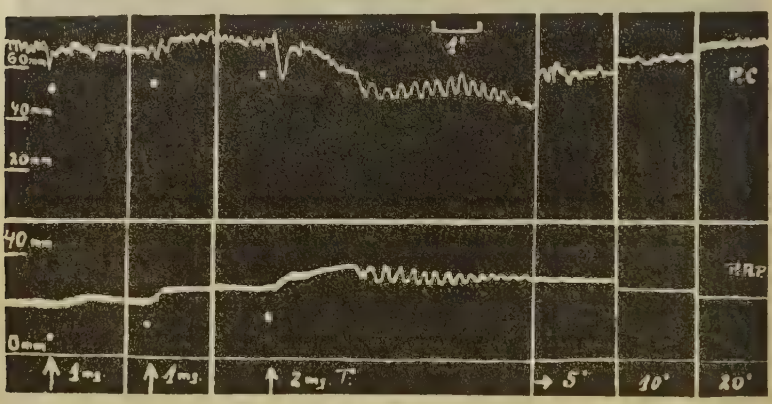



Fig. 27 - Coelho de 1,7 kgm. Explicação no texto.

O exame dos graficos aqui representados mostra com muita clareza que a tripsina é capaz de produzir no coelho e no gato um colapso circulatorio mais ou menos grave ou mortal, conforme a dose.

Nas condições de anestesia da experiencia, a dose capaz de produzir um colapso, esteve compreendida entre 0,60 mg. e 1 mg. de tripsina cristalina por quilo de peso, no gato e 2 mgs. a 3 mgs. por quilo de peso, no coelho.

k) Efeitos circulatorios produzidos pela tripsina no cão.

O mesmo efeito hipotensor da tripsina, já descrito para o gato e para o coelho, foi tambem constatado para o cão.

Os cães utilizados eram anestesiados pela injeção de 4 a 6 cc. de uma solução contendo 2 % de cloridrato de morfina, mais 0,03 % de atropina. Um complemento pelo éter era geralmente uzado.

Embora não tenhamos levado muito longe a analise dos efeitos circulatorios da tripsina nesta especie animal, o papel do figado pareceu-nos de grande importancia na produção do efeito hipotensor da tripsina.

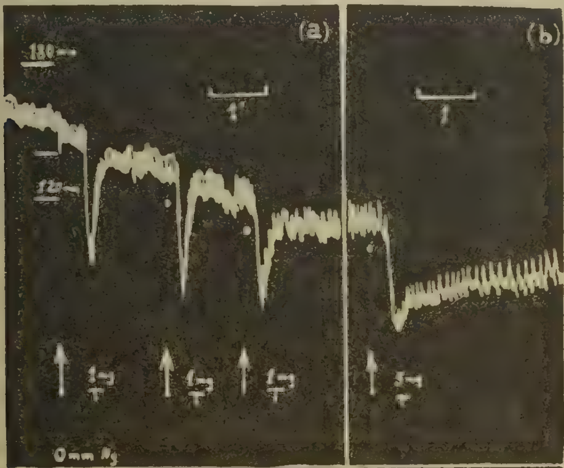



Fig. 28 - Cão de 12 kgms. de peso. Efeito hipotensor da tripsina.

No cão, a tripsina produziu dois efeitos muito constantes. Logo em seguida á injeção de pequenas doses do fermento, a pressão descia bruscamente de alguns centimetros de Hg. Uma recuperação rapida embora incompleta, era observada. Depois de varias injeções da mesma dose do fermento o nivel da pressão carotidiana descia de maneira nitida. Numa das experiencias realizada com um cão de 6 kgms., tres injeções da mesma dose de tripsina (1 mg.), determinaram uma descida da pressão de 130 mm. Hg. a 90 mm. Hg. Neste ultimo nivel, manteve-se durante muitos minutos.

A experiencia da fig. 28, realizada em um cão de 12 kgms. de peso, mostra os dois efeitos descritos. A cada injeção de 1 mg. de tripsina na veia femoral, a pressão caiu bruscamente de alguns cms. de Hg. Não sendo nunca total o recobro, a pressão se mantinha afinal em nivel sempre inferior ao que era dantes. Um efeito mais demorado foi obtido com a injeção de 5 mgs. de tripsina.

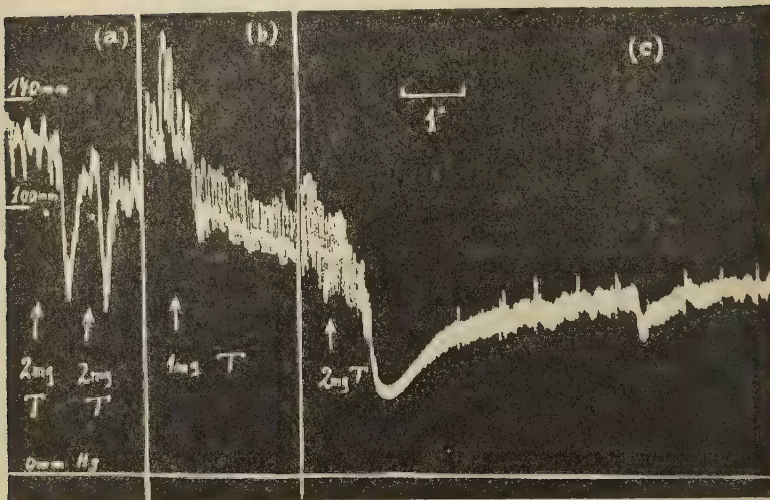



Fig. 29 - Cão de 6 kgms. de peso. Em (a) duas injeções de 2 mgs. de tripsina na veia femoral. Em (b) e (c) injeção de 1 mg. e 2 mgs. de tripsina, num dos ramos da veia porta.

A participação do figado foi constatada na experiencia da fig. 29. Na secção (a) duas injeções de 2 mgs. de tripsina produziram apenas duas quédas evanescentes da pressão carotidiana seguidas de recobro quasi completo. Na secção (b) 1 mg. de tripsina, injetado diretamente num dos ramos da veia porta, produziu uma quéda sustentada da pressão. Na secção (c) a injeção de 2 mgs. de tripsina, novamente na veia porta, produziu uma quéda consideravel da pressão com recobro lentissimo, simulando mesmo um verdadeiro estado de choque.

## DISCUSSÃO

Em publicações recentes admitimos a hipótese de que a tripsina agisse indiretamente por intermedio de uma substancia préexistente nos tecidos e libertada pela ação especifica da enzima proteolitica. De fato, o fenomeno muito nitido e de caracter geral, da *dessensibilização do musculo á tripsina*, sugére que a sua ação não seja direta, mas se exerça por intermedio de uma substancia ativa que *se esgota*. Com efeito, o fenomeno da dessensibilização tal como é observado com veneno de cobra e de abelha (KELLAWAY, 1929, FELDBERG & KELLAWAY, 1937, RICHTER, 1938) e com o choque anafilatico, exige a suposição de que alguma coisa se esgota. No caso do veneno de cobra essa alguma coisa que se esgota é um mediador de natureza ainda

discutida (histamina?, lipoides capazes de se transformarem em substancias semelhantes á lisocitina?). No caso do choque anafilático *in vitro* (sobre o utero e intestino de cobaia) certamente o que se esgota é o chamado anticorpo anafilático existente nos tecidos do animal sensibilizado.

Ainda mais: para explicar a experiencia da Fig. 1, em que apenas 1 γ de tripsina em 30 cc. de banho de Tyrode foi suficiente para produzir contração maxima do utero de cobaia, tivemos que admitir que a libertação dessa substancia ativa (muito provavelmente histamina) precedesse qualquer desdobramento das proteinas tissulares. Assim, muito antes de se verificarem os efeitos destruidores da tripsina, uma descarga de substancia ativa tornaria patentes certos efeitos farmacologicos. Esta hipótese permite explicar o efeito brusco, quasi instantaneo, que se traduz por um colapso circulatorio mortal, no gato, em seguida a injeção de alguns miligramos do fermento. Seria muito pouco provavel que a libertação de uma substancia hipotensora exigisse um desdobramento de proteinas para se tornar efetiva, quando o efeito se verifica alguns segundos depois da injeção da enzima. Muito mais improvavel ainda seria que o efeito mortal fosse consequencia da ação corrosiva (hemorragias e destruições tissulares) da tripsina.

A idéa de que imediatamente depois de se fixar sobre as proteinas tissulares, a tripsina produza uma descarga de substancia ativa, provavelmente histamina, fornece a base para uma explicação do fenomeno de dessensibilização ás pequenas doses. Com efeito, se admitimos que toda a histamina ligada a uma primeira capa de tecido diretamente agredida pelo fermento, é imediatamente mobilizada, uma segunda descarga de histamina só seria possivel depois da destruição total dessa primeira capa de proteinas. Durante o tempo necessario para o desdobramento dessa primeira camada tissular, o musculo se mostraria dessensibilizado.

Justamente essa capacidade da tripsina, de produzir inicialmente uma descarga de uma substancia farmacologicamente ativa, tornou interessantes os resultados acima referidos. Muito antes de produzir efeitos deleterios, já a tripsina é capaz de produzir efeitos farmacologicos extremamente importantes. Insistimos neste ponto, porque é este aspéto da ação da tripsina sobre os tecidos vivos *in vitro* e *in vivo,* que distingue os nossos resultados de todos os outros anteriormente observados e registados no começo deste trabalho. O que interessou até agora aos pesquisadores que se ocuparam da ação da tripsina, foi antes o seu efeito tardio, corrosivo, sobre os vasos sanguineos, tecido celular subcutaneo, etc. O que a nós interessou foi antes o seu

efeito agudo, imediato, que só póde ser explicado pela mobilização de substancias ativas préexistentes nos tecidos. Os fatos aqui relatados são assim um exemplo muito nitido do que DALE (1933) designou como auto-farmacologia.

Em experiencias aqui relatadas pudemos dissociar a ação deleteria da tripsina, da sua ação farmacologica. Um corno uterino de coelha em diestro, mantido em contato com 4 mg. do material cristalino, durante 30 minutos, nenhuma reação apresentou, ao passo que um corno uterino de cobaia, mantido pouco mais de meio minuto em contato com 1 $\gamma$ de tripsina, reagiu com uma contração maxima.

Pudemos ainda excluir qualquer efeito inespecifico da tripsina sobre as terminações nervosas motoras simpaticas (experiencias com o utero de coelha em diestro).

A atropinização do musculo liso do intestino do gato, permitiu ainda excluir a colina e a acetilcolina, como possiveis mediadores da ação da tripsina.

A adenosina exerce uma ação relaxante sobre todos os musculos lisos de mamiferos, excetuado o utero de cobaia (GADDUM, 1936). Particularmente os efeitos inotropo e cronotropo positivos, observados sobre o coração isolado, de coelho e cobaia, dificilmente poderiam coexistir com a idéa de uma libertação de adenosina.

A ação vaso-depressora observada em seguida á injeção de tripsina no coelho, seria ao contrario vantajosamente explicada pela mediação de adenosina libertada pelo agente triptico. Efectivamente a histamina, quando injetada intravenosamente, no coelho, determina habitualmente uma elevação evanescente da pressão carotidiana seguida de baixa discreta. Entretanto, em certas condições de anestesia, a capacidade da histamina, de produzir uma baixa da pressão arterial, mesmo no coelho, tem sido observada (FELDBERG, 1927). Além disso a injeção de histamina na veia do coelho não realiza exatamente as condições de uma libertação de histamina nos tecidos. O circuito percorrido pela histamina no primeiro caso:

— Veia aferente ⟶ coração ⟶ pequena circulação ⟶ coração ⟶ sistema arterial ⟶ capilares, — é essencialmente diferente do circuito percorrido pela histamina quando libertada nos tecidos:

— Capilares ⟶ sistema venoso ⟶ coração ⟶ pequena circulação ⟶ coração ⟶ sistema arterial.

O valor de cada um desses segmentos do aparelho circulatorio na regulação da pressão arterial é diverso, e a natureza do circuito percorrido pela histamina póde perfeitamente explicar a diversidade de efeitos produzidos quando injetada na veia ou libertada nos tecidos. Uma analogia muito sugestiva seria a do choque anafilático no coelho,

habitualmente interpretado (GADDUM, 1936) como consequente a uma descarga de histamina pela combinação do antigeno com o anticorpo ao nivel dos tecidos. Ora, o sinal mais constante do choque anafilático no coelho é uma quéda brusca da pressão arterial (ARTHUS, 1909, SCOTT, 1910, DRINKER & BRONFENBRENNER, 1924).

Em favor de ser a histamina o mediador da ação da tripsina, apresentamos os seguintes factos:

1) A tripsina é capaz de libertar histamina do pulmão de cobaia perfundido com soluções da enzima (ROCHA E SILVA, 1938, 1939*c*).

2) Os musculos lisos testados dispõem-se em uma série de sensibilidade decrescente á tripsina, sensivelmente a mesma em que se dispõem em relação a sensibilidade á histamina (excetuando-se o utero da rata virgem):

Utero de cobaia $>$ Intestino de cobaia $>$ Intestino de gato $>$ Intestino de coelho $>$ ou $=$ Intestino de rato $>$ Utero de coelha em diestro $>$ Intestino de camondongo.

Particularmente este ultimo, intestino de camondongo, insensivel á ação da histamina, mostrou-se tambem refratario á ação da tripsina. Ao contrario o utero de cobaia, extremamente sensivel á ação da histamina, mostrou-se sensivel a uma concentração de tripsina de 1/30 milhões no banho de Tyrode.

3) O quadro do choque á tripsina, no gato, tem analogias marcadas com o quadro de envenenamento pela histamina. Num e noutro caso, uma quéda da pressão carotidiana coincide com um embaraço forte na circulação pulmonar.

4) Um fragmento de utero de cobaia, previamente tornado refratario á ação da histamina, tambem se torna praticamente refratario á ação da tripsina.

5) Um fragmento de intestino de cobaia, fortemente contraído sob a ação da tripsina, relaxa instantaneamente pela adição de pequena dose de adrenalina ao banho de Tyrode. Ora, fato semelhante foi recentemente descrito por UNGAR & COLL., como ocorrendo com a ação da histamina.

Contra a hipotese histaminica estaria o unico fato de que o utero da rata virgem, que se relaxa sob a ação da histamina, se contráe fortemente sob a ação da tripsina. Das substancias ativas conhecidas, apenas a colina e a acetilcolina exercem uma ação tónica sobre o utero da rata virgem, ação essa inibida pela atropinização prévia do musculo. Vimos que a ação tónica da tripsina sobre o utero da rata virgem não é inibida pela atropinização do orgão. A mediação de uma substancia desconhecida deve ser aqui encarada, tanto mais que as substancias habitualmente admitidas agirem pela mediação

de substancias ativas (veneno de cobra, antigeno sobre o utero da rata anafilatizada), exercem uma ação tónica sobre o utero da rata virgem (KELLAWAY, 1929, KELLAWAY, 1930, RICHTER, 1938). Não é impossivel que uma mesma substancia, de natureza ainda desconhecida, existente no utero da rata virgem, venha explicar os efeitos tónicos daquelas substancias e da tripsina.

A possibilidade de que a histamina libertada internamente na propria fibra muscular tenha um efeito excitante sobre o utero da rata virgem foi já aventada por outros pesquisadores. De qualquer maneira um fato singular como a ação discrepante da tripsina sobre o utero da rata virgem não é suficiente para invalidar todas as evidencias apresentadas e que justificam a idéa de uma mediação histaminica.

## PHARMACOLOGY OF TRYPSIN

### ACTION ON MAMMALIAN SMOOTH MUSCLES AND ISOLATED HEART. CIRCULATORY EFFECTS OF TRYPSIN.

#### EXPERIENCES WITH A CRYSTALLINE MATERIAL

*Abstract*

*1) — This paper deals with the pharmacological and pharmacodynamic action of a preparation of crystalline trypsin.*

*2) — As perfusion fluid for plain muscle and mammalian heart (Langendorff's device), we employed a Tyrode solution in which the* $MgCl_2$ *was substituted by the anhydrous* $MgSO_4$*. The crystalline material of trypsin was supplied with an equal weight of anhydrous* $MgSO_4$*. Instead of freeing the proteolytic enzyme from its accompanying salt, we dissolved 50 mgs., of the material in 100 cc. of Tyrode solution without magnesium sulphate. By this way we obtained a solution of trypsin in Tyrode solution, in which the concentration of anhydrous magnesium sulphate was the same as in the perfusion Tyrode solution. In the experiments in which we investigated the circulatory effects of large amounts of trypsin, we employed the crystalline material submitted to dialysis against HCl N/100, in order to obtain a solution free of magnesium sulphate.*

*3) — Action upon the smooth muscle of guinea-pig uterus: Trypsin exerts a powerfull contracting action upon the guinea-pig uterus, preceeded by a latent period which varied from some seconds to a few minutes. The guinea-pig uterus is extremely sensitive to trypsin. Fig. 1, shows the action brought forward by 1 γ of the crystalline material. The same figure shows the desensitization of the muscle for increasing doses of trypsin. The experiment illustrated by*

*fig. 2 has shown an incomplete but very clear desensitization to 0,25 mg. of trypsin. We can see a progressive decreasing of the intensity of the reaction and a lengthening of the latent period. Fig. 3 shows that the desensitization is not always an absolute phenomenon since after two or three contractions with a large dose, the muscle frequently reacted with a small dose, toward which it had shown an almost complete desensitized state.*

*4) Action upon the guinea-pig gut: Fig. 4 shows the effect produced by two successive (upper and low tracings) additions of 0,5 mg. of trypsin. Some sporadic contractions (not peristaltism), immediately reversible, like those produced by small doses of histamine, can be seen superimposed to the increased tonus. Fig. 5 shows that even after five additions of trypsin the reaction of the muscle to histamine appears unimpaired. Fig. 6 shows a very clear, while not complete, desensitization of a fragment of guinea-pig gut to 0,1 mg. of trypsin.*

*5) — Action upon rabbit gut: The rabbit intestine was found to be less sensible to trypsin than the guinea-pig uterus and intestine. The desensitization is very easily obtained even with very great doses of the enzyme. (Fig. 7).*

*6) — Action upon the uterus of the rabbit in diestrus: The female rabbits employed in these experiments were separated from males during 40 days. The experiment referred to in Fig. 8 was made with an uterine horn, maintained 24 hours in the ice-box. The muscle was completely insensible to 4 mgs. of trypsin acting during more than 30 minutes. We can, by this way, dissociate the deleterious effect of trypsin from its pharmacological action, since this uterine horn was probably partially digested by the ferment, without showing any apreciable reaction. The opposite experiment was that referred to in fig. 1, in which a guinea-pig uterus was sensible even to a dose of 1 γ of the ferment in a bath of 30 cc. It is improble that in 40 seconds this small quantity of enzyme would produce any apreciable damage of the muscular tissue. The experiments with the rabbit uterus have shown clearly that the sensitivity of the muscle to trypsin is closely related to its sensitivity to histamine and by no means to its sensitivity to adrenaline (Fig. 9 and 10).*

*7) — Action upon the cat gut. Influence of the atropinization: The sensitivity of the cat intestine to trypsin was found to be only a little less strong than that of the guinea-pig gut. The desensitization of the cat gut was very hardly obtained. Fig. 11 (left) shows the effect of three additions of 0,12 mg. of trypsin to the bath. The sensitivity of the same fragment of cat intestine to histamine*

*is shown in the same figure (right). Fig. 12, illustrates a typical experiment in which we observed a partial desensitization of the cat gut. We can see a decreasing in the intensity of the reaction and a lengthening of the latent period. Fig. 13 shows the effect of the atropinization of the cat intestine on the tonic action of trypsin. Even after the addition of 0,6 mg. of atropine, no inhibitory action could be observed.*

*If we admit that trypsin acts upon the gut by the mediation of some active substance liberated by its specific action, this last experiment permits to discard the possibility of a liberation of choline or acetyl-choline.*

*8) — Action upon the rat and mouse jejunum: Fig. 14 a shows the effect brought forward by trypsin and histamine upon the rat jejunum. Fig. 14 b shows desensitization of the rat gut to 0,25 mg. of trypsin. Fig. 15 shows the insensitivity of the mouse gut to both trypsin and histamine.*

*9) — Action upon the virgin uterus of the rat: The experiment referred to in this section is very interesting since the virgin uterus of the rat behaves itself in a very discrepant manner under the action of substances which liberate histamine (antigen upon the anaphylactized smooth muscle, snake- and bee-venom). If we admit that their action on smooth muscle is brought forth by liberation of histamine, the discrepancy presented by the virgin uterus of the rat is a very embarrassing one, since histamine has a relaxing action upon the uterus of this animal species. The virgin uterus of the rat behaves itself toward trypsin like all the smooth muscles upon which trypsin exerts a powerfull stimulant action (Fig. 16 a). Since atropinization (Fig. 16 b) has no effect upon the stimulant action of trypsin, we must not admit the mediation of choline nor acetyl-choline. The possibility of an unknown substance which could be liberated from the virgin uterus of the rat is to be considered.*

*10) — The uterus of virgin guinea-pig, poisoned by large doses of histamine, loses its capacity for reacting with both histamine and trypsin (Fig. 17). This is a strong evidence of a mediation of histamine in the trypsin effect.*

*11) — The guinea-pig gut strongly contracted with 0,25 mg. of trypsin relaxes almost instantaneously by the addition of 50 $\gamma$ of adrenaline (Fig. 18).*

*12) — Action upon the guinea-pig and rabbit isolated heart: Little doses produced irregularly a little chronotropic and inotropic positive reaction of the essayed hearts. (Fig. 19, 20 and plate 16). Larger doses bring forth a depressing action upon the*

*heart. Sometimes after the injection of a considerable dose of the ferment, the heart stopped in mid-position. A diminution of the coronary flow (the upper figures in the tracings represent the time in seconds necessary for the passage of 3,5 cc. of perfusing fluid through the vessels of the heart) was always observed by perfusing both the guinea-pig and rabbit heart.*

*13) — Circulatory effects of trypsin on cat and rabbit: The intravenous injection of trypsin in cats produced always a more or less steep fall in the carotid blood pressure, after a short latent period (Fig. 21). Fig. 22 shows a rapid fall of blood pressure followed immediately by death . This effect was obtained by an intravenous injection of 3 mgs. of trypsin freed from magnesium sulphate by dialysis. The post-mortem examination of all cats killed by trypsin have shown a great dilatation of the right heart, indicating a stasis in the pulmonary circulation. Fig. 23 shows the effect on both the carotid blood pressure and the pressure in the pulmonary artery. We can see that the injection of 0,25 mg. of trypsin, intravenously in a cat of 2 kgs., produced a steep fall of the systemic blood pressure and a concomitant rise in the pressure of the pulmonary artery. A desensitization of the pulmonary artery toward 0,25 mg. of the enzyme may be seen. Fig. 24 is the continuation of the precedent record. The injection of 4 mgs. of trypsin produced a fall of the pressure in the carotid artery followed by death. A conspicous rise of the pressure in the pulmonary artery can also be seen. Post-mortem observations have never shown hemorrhages in the organs. Only a little pulmonary oedem with some emphysem could be seen.*

*Fig. 26 shows the effect of dialyzed trypsin (free of magnesium sulphate). We can see two steep falls of the blood pressure followed by incomplete recovery (intravenous injection of 2,5 mgs. of trypsin in a rabbit of 1,7 kg. weight). A further injection of 5 mgs. of trypsin produced collapse and death. The same signs of pulmonary stasis were seen in the post-morten examinations of all rabbit that died acutely by intravenous injection of trypsin. Records of the pressure in the little circulation were taken (Fig. 27). We can see that concomitantly with a fall in the carotid artery (upper tracing) a standing increase in the pulmonary artery pressure (lower tracing) was verified.*

*14) — Circulatory effects in dogs: Trypsin exerts upon dogs a conspicuous hypotensive action even in doses comprised between 0,05 and 0,1 mg. by kilo (Fig. 28). The injection made directly in one branch of the portal vein is followed by a stronger fall of the systemic pressure than the injection in the femoral vein (Fig. 29).*

*15) — The histamine liberating capacity of trypsin, brought into evidence in experiments of lung perfusion, furnished the theoretical basis for one explanation of its stimulant action upon smooth-muscle. As a matter of fact we observed that the smooth muscles range themselves, in relation to their sensitivity to trypsin, in the following scale very similar to that which we could obtain ranging them in respect to their sensitivity to histamine (excepting the virgin uterus of the rat):*

*Guinea-pig uterus > guinea-pig gut > cat gut > or = rat gut > rabbit uterus > mouse gut.*

*16) — The hypothesis is made that the first step in the splitting of the tissues proteins would be a liberation of histamine. Before any corrosive action of trypsin would be exteriorizated, that active substance would bring forth very conspicuous pharmacological actions.*

*17) — A very clear result obtained in our experiments is the evidence of a linkage of the enzyme with the tissues. Whatever may be the explanation for the mechanism of its action, it has been stated that long after carefully washing out with Tyrode, the enzyme proceeds in its stimulant action upon the smooth-muscle.*

*18) — The similarity of effects produced by trypsin upon the smooth-muscle as well as of its circulatory effects upon cats and rabbits and of those produced by antigen upon the isolated organs and the circulatory apparatus of sensitized animals, suggests that the study of the pharmacological properties of trypsin must throw some light into these complex phenomena. Also the pharmacology of trypsin must be able to throw light into the pharmacology of snake-venoms and micro-organism toxins, since these venoms and toxins contain very active proteolytic enzymes.*

*Our thanks are due to Prof. J. Northrop of the Rockefeller Institute of Princeton, who supplied us with his crystalline trypsin.*

## BIBLIOGRAFIA

ACHALME, P. — 1901 — Recherches sur les propriétés pathogènes de la trypsine. *Ann. Inst. Pasteur,* **15**, 737-752.

ARTHUS, M. — 1909 — La séro-anaphylaxie du lapin. *Arch. Intern. de Physiol.,* **7**, 471-526.

ARTHUS, M. — 1921 — De l'anaphylaxie à l'immunité. Masson & Cie. Paris.

AUER, J. — 1911 — Lethal cardiac anaphylaxis in the rabbit. *Journ. of Exp. Med.,* **14**, 476-496.

BARSOUM, G. S. & J. H. GADDUM — 1935 — Pharmacological estimation of adenosin and histamine. *Journ. of Physiol.,* **85**, 1-14.

Bergmann, G. von & N. Guleke — 1910 — Zur Theorie der Pankreas-Vergiftung. *Münchner Med. Woch.* 57, 1673-1678.

Boerner-Patzelt, D. — 1923 — Zur Kenntnis der histologischen Veraenderungen bei Trypsinvergiftung. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 99, 253-260.

Dale, H. H. — 1933 — Progress in Auto-pharmacology. *Bull. of the Johns Hopkins Hospital*, 53, 297.

Drinker, C. K. & J. Bronfenbrenner — 1924 — The pulmonary circulation in anaphylactic shock. *J. of Immunology*, 9, 387-406.

Feldberg, W. — 1927 — The action of histamine on the blood vessels of the rabbit. *Journ. of Physiol.*, 63, 211-216.

Feldberg, W. & C. H. Kellaway — 1937 — The circulatory and pulmonary effects of the venom of the australian copperhead (Denisonia superba). *Aust. Journ. of Exper. Biol. and Med. Science.*, 15, 81-95.

Feldberg, W. & C. H. Kellaway — 1938 *a* — Liberation of Histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra-venom. *Journ. of Physiol.*, 94, 187-226.

Feldberg, W., C. H. Kellaway & H. F. Holden — 1938 *b* — The formation of lysocithin and of a muscle-stimulating substance by snake venoms. *Journ. of Physiol.*, 94, 232-248.

Friedmann, M. & L. N. Katz — 1938 — Renal insufficiency following trypsin injection into the renal arteries. *Journ. of Exp. Med.* 58, 485-504.

Gaddum, J. H. — 1936 — Gefaesserweiternde Stoffe der Gewebe. Georg Thieme. Leipzig.

Guleke, N. — 1906 — Ueber die experimentelle Pankreasnekrose und die Todesursache bei akuten Pankreaserkrankungen. *Arch. f. klin. Chir.*, 78, 845-895.

Gunn, J. A. — 1926 — The action of histamine on the heart and coronary vessels. *Journ. of Pharm. and Exp. Ther.*, 29, 325-337.

Kellaway, C. H. — 1929 — The action of australian snake venoms on plain muscle. *Brit. Journ. of Exp. Path.*, 10, 281-303.

Kellaway, C. H. — 1930 — The anaphylactic reaction of the isolated uterus of the rat. *Brit. Journ. of Exp. Path.*, 11, 72-80.

Kunitz, M. & J. Northrop — 1935 — Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor and an inhibitor-trypsin compound. *Journ. of Gen. Physiol.*, 19, 991-1007.

Oppenheimer, C. — 1926 — Die Fermente und ihre Wirkungen. Georg Thieme. Leipzig.

Pfeiffer, H. & F. Standenath — 1922 — Zur Kenntnis des Trypsinvergiftung und verwandter Zustaende. *Klin. Woch.*, 1933-1935.

Pfeiffer, N. & F. Standenath — 1923 — Zur Kenntnis des Reticulo-Endothelialen Apparates und der Trypsinvergiftung. *Klin. Woch.*, 499-500.

Richter, R. — 1938 — Ueber den Zusammenhang zwischen Toxizitaet und Darmwirkung bei Klapperschlangen- und Bienengift. *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, 189, 172-187.

Rocha e Silva, M. — 1938 — Ação da tripsina sobre o intestino e utero isolados de cobaia; libertação de histamina do pulmão, pela perfusão com soluções de tripsina. *Arqu. Inst. Biol.*, S. Paulo. 9, 145-163.

Rocha e Silva, M. — 1939 *a* — Action de la trypsine sur la musculature lisse de l'intestin isolé du cobaye. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 130, 181-183.

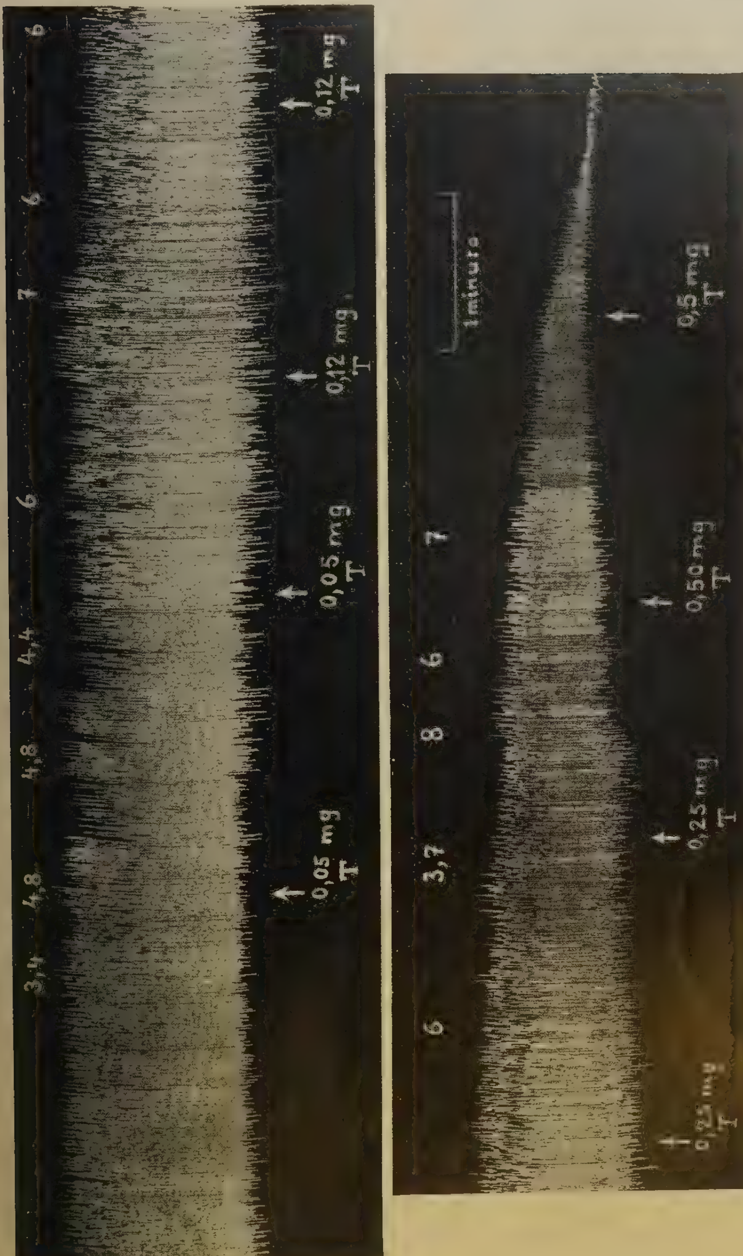
ROCHA E SILVA, M. — 1939 *b* — Action de la trypsine sur l'utérus isolé du cobaye. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **130**, 184-185.

ROCHA E SILVA, M. — 1939 *c* — Libération de l'histamine par la perfusion du poumon du cobaye au moyen de la trypsine. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **130**, 186-188.

ROCHA E SILVA, M. — 1939 *d* — Beiträge zur Pharmakologie des Trypsins. I-Wirkung des Trypsins auf die glatten Muskeln des Duenndarmes und die Gebärmutter von Säugetieren. Die Freisetzung von Histamin nach Durchströmung der Meerschweinchenlunge mit Trypsin. *(Em curso de publicação).*

ROCHA E SILVA, M. — 1939 *e* — Beiträge zur Pharmakologie des Trypsins. II-Wirkung des Trypsins auf den Blutkreislauf bei Katze, Kaninchen und Hund. *(Em curso de publicação).*

UNGAR, G., J. L. PARROT, et D. BOVET — 1937 — Inhibition des effects de l'histamine sur l'intestin isolé du cobaye par quelques substances sympathicomimetiques et sympathicolytiques. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **124**, 445-446.




Traçado de coração isolado de coelho. Metodo de Langendorff. Explicação no texto, p. 111

# CICLO EVOLUTIVO DE "ELSINOË AUSTRALIS BITANCOURT & JENKINS", AGENTE DA VERRUGOSE DA LARANJA DOCE [1]

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins

Do Instituto Biologico e do Bureau of Plant Industry, Dept. of Agriculture. Washington

Com as estampas 17-25

## INTRODUÇÃO

A forma perfeita do fungo que causa a verrugose da laranja doce foi encontrada em 1936 sobre uma laranja doce da variedade Baía, *(Citrus sinensis* OSB.) que se achava num lote enviado ao Instituto Biologico, do interior do Estado de São Paulo, provavelmente de Torrinha. O fungo, até então conhecido, pela sua forma conidiana ou imperfeita sob o nome de *Sphaceloma fawcetti viscosa* JENKINS (7) foi novamente descrito sob o nome de *Elsinoë australis* BITANCOURT & JENKINS (1). O exemplar tipo que serviu de base para essa descrição foi depositado no Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo sob o numero 2256 e nas coleções micológicas do Bureau of Plant Industry do Departamento da Agricultura dos Estados Unidos sob o numero 72629. O unico fruto que constitue este exemplar foi representado em outra publicação (1, fig. 1). O mesmo fungo foi novamente encontrado na sua forma perfeita em Montenegro, Rio Grande do Sul, sobre uma laranja doce da variedade «tangerina», em 9 de Abril de 1937 por H. S. FAWCETT e BITANCOURT e depositado no herbario da Secção de Fitopatologia sob o numero 2571.

A verrugose da laranja doce, que ataca tambem diversos outros hospedes além da laranja doce (3) é conhecida sómente na Argentina, Uruguay e Paraguay, onde é aparentemente generalizada, e no Brasil, onde até hoje sómente foi assinalada em alguns Estados do Centro e do Sul (8).

Os estudos que fazem o objeto do presente trabalho foram efetuados com o material tipo, sendo entretanto a descrição da morfologia do fungo igualmente baseada sobre o segundo especimen encontrado, proveniente do Rio Grande do Sul. Tiveram por fim estabelecer definitivamente as relações genéticas entre *Elsinoë australis* e sua forma imperfeita, e confirmar, com culturas provenientes dos ascosporos do fungo, a sua patogenicidade em relação á laranja doce, anteriormente

[1] Trabalho apresentado á Primeira Reunião Sul-Americana de Botanica. Rio de Janeiro, 12 a 19 de Outubro de 1938.

demonstrada com culturas obtidas da forma imperfeita (3). A escassez do material disponivel não permitiu que se levasse a cabo o estudo citológico, desejavel para completar este trabalho.

Seguindo WORONICHIN (10), designamos por «ascoma», no presente trabalho, o estroma fertil onde se desenvolvem os ascos, distinguindo-o assim do estroma da forma imperfeita.

## MORFOLOGIA DA FORMA PERFEITA

Conforme foi descrito em publicações anteriores (1, 3, 7), a forma imperfeita de *Elsinoë australis* é visivel exteriormente na superficie das lesões, como pequenas saliencias, geralmente situadas na parte central da lesão, que podem cobrir uniformemente, formando um revestimento continuo, ou então estar mais separadas, e dispostas irregularmente, ou segundo linhas concentricas. Tais saliencias são as frutificações, ou seja, acervulos ou esporodoquios, da forma imperfeita. Têm coloração pardo-clara *(vinaceous buff)* [2] em alguns casos, parda ou marron escura até preta *(blackish brown)* em outros, o que parece corresponder na maioria dos casos a dois grupos ou raças distintas de *E. australis*, grupos esses distinguidos por seus caracteres culturais e que foram designados em publicações anteriores (2, 3) por grupo I ou ainda raça viscosa, e grupo II ou raça preta, respectivamente.

Quando se examina a superficie das lesões de uma laranja com uma lupa de forte aumento, a forma perfeita aparece, a principio, como pequenas regiões de ruptura nas saliencias ou esporodoquios da forma imperfeita. Tais rupturas deixam ver os tecidos subjacentes, de côr mais clara, o que, no caso de ser a forma imperfeita do grupo II, ou escura, permite distinguir individualmente todos os pontos em que se estão constituindo as frutificações da forma perfeita, ou ascomas (Estampa 17, *A*).

Estes, ao se desenvolverem, acentuam a ruptura dos esporodoquios, e finalmente se dilatam exteriormente como pequenas saliencias arredondadas de côr clara (Est. 17, *B*). A superficie de uma lesão de verrugose da laranja doce, do grupo II, onde se acham frutificações da forma perfeita, apresenta-se, pois, com a coloração escura da forma imperfeita marcada por inumeros pontinhos mais claros, indicando a presença de ascomas. No caso do grupo I, os ascomas distinguem-se tão sómente dos esporodoquios pela sua forma arredondada e abaúlada, ligeiramente saliente acima da superficie dos esporodoquios (Est. 17, *C*).

---

[2] As côres são indicadas aproximadamente, em português. A indicação precisa em inglês, é baseada em: Ridgway, R. Color standards and color nomenclature. 43 pp. 1912.

Aparentemente os ascomas podem continuar o seu desenvolvimento depois de ter sido destacada do pé a fruta atacada de verrugose, porquanto o especimen tipo, deixado cerca de um mês, para estudo, na mesa do laboratorio, parecia, no fim desse prazo, apresentar um numero bem maior de ascomas do que quando examinado pela primeira vez.

Este fáto, junto com a constatação da extrema raridade da forma perfeita, — que temos procurado em centenas de frutas e sómente encontrámos em frutas ainda no pé, no exemplar de Montenegro, Rio Grande do Sul — indica a possibilidade de suas frutificações sómente se formarem em abundancia em frutas caídas no chão, possivelmente após alguns meses de hibernação, como sucede com a forma perfeita de outros ascomicetos.

O exame dos ascomas em secções transversais, confirma o resultado da observação superficial e revela que eles têm a sua origem em pequenos primordios celulares, geralmente de coloração mais clara que o resto do tecido do fungo, e situados no interior do pseudoparenquima (Est. 17, *D* e *F*), de que é constituida a forma imperfeita, ou seja, os acervulos ou esporodoquios. E' possivel, entretanto, que em alguns casos os ascomas se formem independentemente da forma imperfeita, diretamente nas celulas epidermicas do hospede. Com a multiplicação dos elementos celulares do inicio do ascoma, os tecidos externos da forma imperfeita que cobrem a frutificação rompem-se e assim formam uma passagem para a dilatação ulterior do ascoma (Est. 17, *F*, *G* e *I*).

Continuando o seu desenvolvimento, o ascoma irrompe na superficie das lesões, formando um pequeno massiço celular saliente, mais ou menos globoso. (Est. 17, *B*). Em secção transversal, o tecido pseudoparenquimático do ascoma, feito de elementos poligonais, de paredes delgadas e hialinas, diferencia-se facilmente dos tecidos externos da forma imperfeita, de paredes mais grossas, feitos de elementos mais alongados no sentido perpendicular á superficie da lesão geralmente interpretados como conidioforos coalescentes e que no tipo II têm coloração mais escura. (Est. 17, *E*, *b*). Nenhuma diferenciação se nota nos tecidos superficiais do ascoma, que, nas fases mais adiantadas do desenvolvimento, simplesmente mostram os seus elementos celulares aparentemente em via de colapso ou desintegração. (Est. 17, *J*, *L*, *M*).

Pela coloração clara, do ascoma, contrastando com os tecidos mais escuros da forma imperfeita, e pelo seu desenvolvimento erumpente bem caracterisado (1, fig. 2, *B*) *E. australis* lembra até certo ponto o fungo *Myriangina mirabilis* P. Henn., que é caracterisado por um bem desenvolvido estroma erumpente (5, est. 2).

No interior do pseudoparenquima mais ou menos homogeneo que constitue o ascoma, diferenciam-se os ascos, que são globosos, munidos de duas paredes, sendo a externa fina e a interna mais espessa principalmente na parte superior (Est. 17, *H* e *K*). Sempre em pequeno numero, os ascos são irregularmente distribuidos no interior do pseudoparenquima, mas geralmente concentrados na parte superior do ascoma. Quando este ultimo é de pequenas dimensões, pode acontecer que sómente um asco consegue encontrar espaço para se desenvolver, abortando os outros, ou simplesmente deixando inteiramente de se desenvolver.

No interior dos ascos temos encontrado de 1 a 8 ascosporos. (Est. 17, *K*). Frequentemente, ao lado de um ascosporo perfeitamente constituido, notam-se no interior do asco outros ascosporos mais ou menos abortados ou de feitio irregular. Outras vezes o ascosporo é solitario, sem vestigio de companheiros. (Est. 17, *H*).

Os ascosporos são semelhantes aos das outras especies do genero, isto é, são hialinos e, em completa maturidade, têm tres septos. As duas celulas superiores são mais grossas e mais curtas que as inferiores. Os esporos são marcadamente constritos na altura do septo mediano, e mais levemente na altura dos outros dois. Alguns esporos têm um septo longitudinal na celula mediana superior. Em regra os esporos são rêtos, mas podem igualmente ser ligeiramente incurvados ou apresentar outras deformações ou irregularidades (Est. 17, *H, c,* e *N*).

Tentámos de diversas maneiras provocar a expulsão dos ascosporos de dentro dos ascomas, conforme foi conseguido com outros representantes do genero *Elsinoë* (6). Todas as tentativas foram infrutiferas, ou porque o material não estivesse em estado de maturação suficiente para que se desse a expulsão, ou porque as condições da experiencia não fossem apropriadas para a provocar.

## GERMINAÇÃO DOS ASCOSPOROS

Diversos ascosporos foram isolados, sendo para isso levadas pequenas secções transversais de ascomas na beira de uma gota de agar ou numa gota d'agua colocadas sobre uma lamina e em seguida comprimidos os tecidos contendo os ascos, para soltá-los e deles libertar os ascosporos.

G e r m i n a ç ã o e m a g u a : — Os esporos libertados em gota d'agua, onde eles assumem por dilatação dimensões maiores que nos cortes montados em lactofenol, foram observados em seguida ao microscopio, notando-se dentro de uma hora a formação de pequenas saliencias na superficie dos esporos, saliencias que em duas horas desenvolviam-se

em pequenas conidias ou esporos secundarios. Por esse processo de brotamento foi observada, em algumas horas, a formação de 2 a 8 conidias por cada ascosporo. Essas conidias tinham as dimensões aproximadas de $6 \times 3 \mu$ e eram de conformação ovalada e coloração hialina (Est. 18, *A-G*).

Em algumas experiencias a gota d'agua onde se achavam os ascosporos secou em menos de 24 horas, ficando entretanto uma leve pelicula de humidade na superficie da lamina, de modo a garantir o desenvolvimento ulterior das conidias (Est. 18, *F-G*). Em outras, os ascosporos permaneceram imersos na gota d'agua durante todo o tempo da observação (Est. 18, *A-D*). Em ambos os casos notou-se que dentro de 24 horas as conidias tinham germinado em um longo filamento miceliano que, no fim desse prazo, alcançava ás vezes mais de 20 vezes o comprimento da conidia, e de secção transversal pouco menor (Est. 18, *E*). Na gota seca as conidias não tinham podido destacar-se do ascosporo, dando portanto a impressão de ter este ultimo germinado por meio de filamentos micelianos. Na gota dágua as conidias tinham-se destacado e afastado a certa distancia dos ascosporos. O desenvolvimento ulterior do tubo germinativo das conidias não foi observado.

Germinação em meio nutritivo: — Certo numero de ascosporos foram transportados individualmente, por meio de uma microagulha, em gotas de meio de cultura de batata-dextrose-agar, colocadas sobre uma lamina de vidro a qual permaneceu mantida dentro de uma caixa de Petri, que, por estar provida de uma pequena camada de agua, se comportou como uma camara humida e impedio a dessecação das gotas de agar.

A germinação dos ascosporos já estava iniciada dentro do prazo de 24 horas, notando-se a formação sucessiva, mas quasi simultanea, de filamentos germinativos nas suas diversas celulas. Esses filamentos, por sua vez, ramificavam-se abundantemente, formando, no prazo de poucos dias, talos iniciais, na forma de pequenos ouriços refringentes iguais aos que se observam com o desenvolvimento das conidias da forma imperfeita (Est. 19).

E' notavel que no talo inicial proveniente de um dos ascosporos isolados havia uma estrutura bem distinta dos outros, e um desenvolvimento bem mais lento, conforme se vê claramente nas fotografias da estampa 19, tomadas a intervalos iguais. Tendo sido os ascosporos tirados de uma unica lesão, que, por sua vez, devia ser proveniente da infecção por um só esporo, tem-se aí uma forte indicação de existirem, em *Elsinoë australis,* variações germinais. Variações somáticas, ou saltações, já foram anteriormente assinaladas para o mesmo fungo. (2,3).

Infelizmente, devido a uma contaminação, a cultura proveniente do esporo cuja germinação foi representada na estampa 19, *D*, não pôde ser conservada, motivo por que não foi possivel compara-la com as demais, no seu desenvolvimento ulterior.

As mesmas experiencias de isolamento de ascosporos, para observação da germinação e obtenção de culturas, foram efetuadas a partir das frutificações do exemplar proveniente do Rio Grande do Sul, porém sem sucesso, provavelmente por estarem mortos os ascosporos.

## CULTURAS MONOASCOSPORICAS E CULTURAS DA FORMA IMPERFEITA (3)

Os talos provenientes da germinação de 10 ascosporos em gota de batata-dextrose-agar, foram transferidos para tubos de cultura e forneceram outras tantas culturas típicas de *Elsinoë australis*, (Est. 20, *C* e *D*). Afim de comparar estas ultimas com culturas provenientes da forma imperfeita, pequenas secções transversais das lesões, tiradas do especimen tipo, em lesão onde não havia ascomas, de dimensões aproximadas de $0{,}5 \times 0{,}3 \times 0{,}02$ milimetros, foram colocadas em gota de batata-dextrose-agar, sobre laminas mantidas em atmosfera, humida, em caixas de Petri. Ao microscopio, essas secções mostravam o pseudoparenquima escuro da forma imperfeita sem vestigios de ascomas, mesmo na sua fase inicial e, no prazo de 24 horas, notava-se a brotação dos elementos celulares, a principio do lado correspondente á superficie das lesões, e finalmente em todos os tecidos do fungo (Est. 18, *H-M*). Nenhuma brotação se nota na região profunda das lesões, o que confirma o que se distingue por coloração apropriada, isto é, que o fungo se desenvolve superficialmente nas lesões de verrugose, cujos tecidos internos são unicamente o resultado da multiplicação celular da planta hospede. No prazo de alguns dias os talos assim conseguidos não apresentavam diferenças dos que eram provenientes da germinação dos ascosporos. Este metodo de isolamento foi usado extensivamente pelo primeiro autor para numerosas culturas da forma imperfeita de *Elsinoë australis* de diversas proveniencias e de outras especies desse genero, e do genero imperfeito *Sphaceloma*.

No fim de mais de um mês (Est. 20, *A* e *C*), e mais tarde, passados mais de dois mêses (Est. 20, *B* e *D*), todas as culturas tidas de ascosporos foram comparadas com as que provieram dos tecidos da forma imperfeita, notando-se uma semelhança completa. Estas culturas enquadravam-se aproximadamente no grupo II (preto) anteriormente descrito para as culturas de *Elsinoë australis* (2).

(3) Todas as culturas de que trata o presente trabalho foram feitas em meio de batata-dextrose-agar, preparado de acordo com duas formulas diferentes (B e C), que foram dadas em outra publicação (4, nota 3). Onde outra não é indicada no texto, foi utilisada a formula C.

Em algumas culturas monoascosporicas observou-se a produção de talos secundarios, indicando a formação, dentro dessas culturas, de conidias carateristicas (Est. 20, *C* e *D, a* e *b*) da forma imperfeita, o que exame microscopico confirmou (Est. 20, *E*).

Uma das culturas provenientes dos tecidos da forma imperfeita, de numero 577 C (Est. 20, *A* e *B, g*) e uma das culturas monoascosporicas, de numero 579 C (Est. 20, *C* e *D, a*), foram conservadas para os estudos que são expostos a seguir.

## INOCULAÇÕES

Comquanto a formação de conidias nas culturas monoascosporicas da forma perfeita, juntamente com a similitude dessas culturas ás obtidas por brotamento dos esporodoquios da forma imperfeita, já constituissem prova da identidade dessas duas formas, foram feitas para verificação de patogenicidade, em 1936, 1937 e 1938 [4], experiencias de inoculações em frutas de laranjeira doce *(Citrus sinensis* Osb.) das variedades abacaxi, pêra e lima, e de laranjeira cravo (? *C. nobilis* Lour. var.) empregando-se para esse fim as culturas 579 C (monoascosporica) em 1936, 1937 e 1938, e 577 C (da forma imperfeita) em 1936. As experiencias se realizaram pelo mesmo processo e nas mesmas arvores do pomar experimental da Cantareira, perto de São Paulo, onde foram feitas as experiencias anteriormente relatadas (3).

Como nas referidas experiencias, verificou-se depois das inoculações uma elevada porcentagem de queda de frutas, não tendo sido possivel fazer mais de 152 leituras, das 799 laranjas inoculadas ou testemunhas. A elevada queda de frutas verificada, embora possivelmente aumentada pelas operações de inoculações, ocorre normalmente nas laranjeiras usadas nas experiencias, nas frutas ainda novas, mesmo não inoculadas, o que indica a necessidade de se efetuarem numerosas inoculações para a obtenção de resultados numericamente apreciaveis. Frutas já parcialmente desenvolvidas não cáem mas não se prestam a experiencias de inoculação, pois os tecidos já estão aparentemente resistentes á verrugose. E', por exemplo, o que se deu com 20 laranjas inoculadas em 14 de Dezembro de 1938, as quais, não apresentaram o menor vestigio de lesões de verrugose. Semelhante resistencia nas frutas já parcialmente desenvolvidas, foi demonstrada por Winston (9) em relação a *Elsinoë fawcetti* Bitancourt e Jenkins. As 20 laranjas de que acabamos de nos ocupar não foram computadas nos resultados abaixo relatados.

Em 1936 as inoculações foram feitas entre 24 de Outubro e 17 de Novembro, no inicio da formação das frutinhas, ou seja de uma

[4] As inoculações de 1938 foram executadas após o encerramento da Primeira Reunião Sul-Americana de Botanica, pelos Srs. J. Franco do Amaral e E. Ract.

a quatro semanas após a queda das pétalas, quando as laranjas mediam, em média, menos de um centimetro de diametro. Em nenhum caso foram inoculadas frutas maiores que 2 cms. de diametro; na maioria dos casos as frutas tinham menos de um centimetro. A variedade abacaxí foi inoculada em primeiro lugar, e quasi todas as frutas inoculadas eram pequenas. As frutas da laranjeira pêra, inoculadas mais tarde, tinham-se desenvolvido um pouco mais, tendo algumas delas mais de um centimetro de diametro. As laranjas cravos eram todas menores que 0,8 milimetros, e nelas se verificou elevada porcentagem de queda.

Em 1937, ano de floração precoce, as experiencias foram feitas entre 14 a 23 de Outubro, mais ou menos nas condições anteriores. Sómente as laranjas lima forneceram resultados, tendo caído todas as frutas das outras variedades inoculadas.

TABELA 1

Inoculações de laranjas doces (*Citrus sinensis* OSBECK) das variedades abacaxi, pêra e lima, e de laranjas cravos (*C. nobilis* LOUR. var.), com uma cultura monoascosporica (579 C) e uma cultura obtida da forma imperfeita (577 C) de *Elsinoë australis*.

| Variedade de Citrus | Anos | Cultura inoculada | Numero de frutas inoculadas | Infecções positivas |
|---|---|---|---|---|
| Laranja abacaxi . . | 1936 | 579 C | 5 | 3 |
| Laranja abacaxi . . | 1938 | » | 27 | 21 |
| Laranja pêra . . . | 1936 | » | 9 | 3 |
| Laranja lima . . . | 1936 | » | 10 | 10 |
| Laranja lima . . . | 1937 | » | 8 | 7 |
| Laranja lima . . . | 1938 | » | 7 | 6 |
| Laranja cravo . . . | 1936 | » | 2 | 2 |
| Laranja abacaxi . . | 1936 | 577 C | 7 | 4 |
| Laranja pêra . . . | 1936 | » | 7 | 5 |
| Laranja lima . . . | 1936 | » | 10 | 10 |
| Testemunha . . . | 1936 | — | 4 | 0 |
| Testemunha . . . | 1937 | — | 34 | 1 (a) |
| Testemunha . . . | 1938 | — | 22 | 0 |

(a) Durante a safra de 1937 (inoculações de 1936), foram encontradas, pela primeira vez, laranjas naturalmente infectadas com verrugose, no pomar experimental onde se fizeram as inoculações. Esperando-se aumento de infecção nos anos seguintes, isto é, nas safras de 1938 e 1939, utilisou-se, nas inoculações de 1937 e 1938, um numero maior de testemunhas do que de costume. O unico caso de infecção observado em 1937 nas 34 testemunhas é considerado como tendo sido produzido espontaneamente. Em 1938 nenhuma das testemunhas apresentou infecção.

Em 1938 as inoculações foram feitas entre 21 de Novembro e 14 de Dezembro, havendo muitas frutas de mais de 2 centimetros de diametro e algumas alcançando 3 centimetros.

A leitura dos resultados das inoculações foi feita em diversas ocasiões, a partir de um mês após a inoculação. As laranjas em que se manifestavam lesões tipicas eram então colhidas e levadas ao laboratorio, sendo confirmada a identificação das lesões por um exame minucioso feito com a lupa binocular.

Os resultados das experiencias de inoculações de 1936, 1937 e 1938 estão condensados na tabela 1, e algumas frutas representativas do resultado da infecção artificial se acham representadas na estampa 21.

Como se vê, de 68 frutas inoculadas com a cultura monoascosporica, 52, ou seja cerca de 77 %, contraíram a infecção, o mesmo sucedendo com 19 das 24 frutas inoculadas com a cultura da forma imperfeita, ou seja 79 %. As experiencias de inoculação com culturas obtidas da forma perfeita e da forma imperfeita do especimen tipo de *Elsinoë australis* confirmaram, pois, os resultados anteriormente publicados (3), demonstrando a patogenicidade desse fungo para a laranja doce e a laranja cravo, onde ele causa a doença conhecida pela designação de verrugose. Ao mesmo tempo, essas experiencias demonstraram que as culturas obtidas dos ascosporos comportam-se, do ponto de vista da patogenicidade, exatamente da mesma forma que as culturas da forma imperfeita, fornecendo assim mais uma prova de identidade dessas duas formas (Est. 21).

As mesmas experiencias confirmaram a formação de lesões secundarias, provenientes, segundo tudo parece indicar, de conidias formadas muito cedo nas lesões primarias oriundas da inoculação artificial (3). Tais lesões secundarias distinguem-se, em geral, das primarias, por suas dimensões muito menores, e tambem por serem muito mais numerosas. As dimensões menores devem ser atribuidas a uma maior resistencia da fruta que se acha mais desenvolvida quando aparecem, nas lesões primarias, as primeiras conidias capazes de produzir as lesões secundarias. Ao passo que um mês após a inoculação sómente se podem ver lesões primarias (Est. 21, *A-E*), cerca de dois mêses depois já são visiveis as lesões secundarias (Est. 21, *H*).

Em 1936, cinco frutas da variedade lima foram deixadas no pé, durante cerca de 7 mêses após a inoculação, para verificação da formação de lesões secundarias. Nestas laranjas foi possivel constatar que o numero de lesões, após esse prazo, era muito superior ao que se observara nas mesmas frutas um mês após a inoculação (Est. 21, *F* e *G*). A comparação das figuras *F*, *G* e *A-E* da estampa 21 bem mostra qual a extensão do ataque de verrugose numa fruta, por meio do mecanismo da infecção secundaria.

O tamanho menor das lesões secundarias não depende, evidentemente, do fato de provirem elas das conidias das lesões primarias,

e sim, tão sómente, da maior resistencia das frutas mais desenvolvidas. Assim as lesões primarias das inoculações de 1938, feitas em frutas já bastante desenvolvidas, tinham dimensões pequenas, comparaveis ás lesões secundarias observadas nas inoculações de 1936 e 1937 (Est. 21, *I*).

## REISOLAMENTO DO FUNGO E COMPARAÇÃO COM ISOLAMENTOS DE OUTRAS PROVENIENCIAS

Das diversas frutas inoculadas foi feito o reisolamento do fungo parasita (Est. 22, *A-F*), e numa série paralela em meio de batata-dextrose-agar (Formula B, vêr nota 3, p. 134) os novos isolamentos foram comparados com as culturas iniciais, de numero 579 C e 577 C, que serviram para as inoculações, sendo constatada a perfeita semelhança de todas elas (Est. 22, *G-N*).

Finalmente, uma ultima comparação cultural foi feita com parte das culturas utilisadas na comparação anterior e mais diversas culturas de *Elsinoë australis* de diversas procedencias, conforme está relacionado na tabela 2.

TABELA 2

Comparação cultural entre a cultura monoascosporica 579 C, a cultura da forma imperfeita 577 C, um dos reisolamentos das inoculações relatadas na tabela 1, 759 C, e diversas culturas de *Elsinoë australis* de diferentes proveniencias. (Ver estampas 23 e 24).

| Letras das estampas 23 | Letras das estampas 24 | Numero | Grupo | Hospede Nome cientifico | Variedade | Localidade | Data do isolamento |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a | A | 577 C | II | *Citrus sinensis* Obs. | baía | Torrinha | 1 Agosto 1936 |
| b | B | 579 C | II | » » . . | » | » | 3 Agosto 1936 |
| c | C, D | 759 C | II | » » . . | pêra (a) | São Paulo | 15 Dezembro 1936 |
| d | E | 81 C | II | ? *C. sinensis* x *C. nobilis* . . . | tangerona | Campinas | 13 Março 1935 |
| e | F | 329 C | II | ? *C. nobilis* Lour . | lar. cravo | (Saltação (b)) | 10 Outubro 1935 |
| f | G | 356 | I | *Citrus sinensis* Osb. | baía | Limeira | 6 Março 1934 |
| g | H | 119 C | I | » » | baía | Tupí | 21 Março 1935 |
| h | I | 383 C | I | » » | » | Campinas | 2 Janeiro 1936 |
| i | J | 969 B | IV | » » | » | Piracicaba | 15 Janeiro 1935 |
| j | K | 44 C | IV | *Citrus nobilis deliciosa* Sw. . . . | tangerina | Sorocaba | 27 Fevereiro 1935 |
| k | L | 254 C | IV | *Citrus sinensis* Osb. | pêra | Dist. Feder. | 5 Julho 1935 |
| l | M | 822 A | III | » » | baía | Limeira | 31 Outubro 1934 |
| m | N | 822 A | III | » » | » | (Saltação (c)) | 31 Outubro 1934 |
| n | O | 330 C | I | » » | » | (Saltação (b)) | 10 Outubro 1935 |

(a) Isolada de uma lesão experimental obtida com a cultura 579 C.
(b) Saltações da cultura 519 B, isolada de uma lesão experimental obtida com a cultura 822 A.
(c) Saltação da cultura 822 A.

Nessa comparação foram utilisados os meios de cultura de batata-dextrose-agar (formulas *B* e *C*), anteriormente empregados em comparações culturais com fungos do grupo *Elsinoë* e *Sphaceloma* (4), sendo parte das culturas feitas em tubos e parte em frascos de Petroff, permanecendo uma metade das culturas em termostato á temperatura de 32º C e a outra na temperatura do laboratorio (em média 25º C). Culturas representativas desta experiencia figuram nas estampas 23 e 24.

Os grupos citados na tabela correspondem aos do trabalho já citado (2). O grupo IV apareceu em isolamentos feitos posteriormente á publicação do referido trabalho e é mencionado aqui pela primeira vez. As culturas deste grupo têm em comum o caráter da coloração do talo que é avermelhado. São culturas convolutas e ligeiramente aveludadas, diferentes, entretanto, do grupo III.

Por esta comparação cultural, foi possivel classificar as culturas provenientes da forma perfeita e imperfeita do especimen tipo de *Elsinoë australis*, no grupo II ou preto, aliás o mais frequentemente encontrado em S. Paulo.

## CARACTERES ANATÓMICOS DAS LESÕES EXPERIMENTAIS

O estudo anatómico das lesões produzidas por inoculação da cultura monoascospórica mostrou a identidade dessas lesões com as lesões naturais (3, est. 6, *D-F*). Em lesões observadas em secções transversais, pouco mais de 40 dias depois da inoculação, (Est. 25, *A* e *B*), nota-se o grande desenvolvimento já alcançado pelo periderma cicatricial, produzido por uma camada geradora relativamente superficial a principio, mas que se incurva em profundeza á medida que forma o referido periderma. Nesse prazo de 40 dias, pois, as lesões mais desenvolvidas são parcialmente salientes e parcialmente desenvolvidas nos tecidos externos da casca da laranja. O fungo desenvolve-se unicamente nas camadas mais externas da lesão, ou seja numa espessura aproximadamente de 25 $\mu$. Nessas lesões novas, o fungo tem a estrutura de um pseudoparenquima hialino, de paredes relativamente finas, de elementos poligonais isodiametricos, de conteúdo protoplasmatico bem concentrado, conforme se póde depreender da coloração escura que toma o protoplasma nas secções coloridas com azul algodão C4B. (Est. 25, *B*). As paredes externas da epiderme da laranja acham-se mais ou menos rasgadas em diversos lugares, sendo licito concluir que nesses intervalos formam-se muito cedo, os conidios que deverão produzir as lesões secundarias.

Em lesões mais velhas, como as que observámos cerca de 7 mêses após a inoculação (Est. 25, *C-F*), nota-se uma estrutura semelhante á que já foi descrita para as lesões naturais (3,7). O fungo, sempre

localisado nas camadas mais externas das lesões, apresenta as suas frutificações bem diferenciadas, geralmente com a estrutura de um esporodoquio, isto é, salientes, formando um massiço pseudoparenquimático onde se distingue uma região externa, com paredes celulares de coloração mais ou menos escura, de espessura maior do que nas lesões novas, e com elementos celulares mais alongados no sentido perpendicular á superficie da fruta, constituindo como que uma palissada de conidióforos densamente coalescentes (Est. 25, *C-F, a*). Mais profundamente, o tecido pseudoparenquimático aproxima-se mais da estrutura observada nas lesões novas, isto é, tem elementos celulares isodiamétricos, de paredes hialinas ou ligeiramente amareladas (Est. 25, *C-E, b*). Na parte mais profunda ainda, distinguem-se hifas de paredes espessas, formando um prosenquima que se imiscúe entre os elementos celulares da parte externa do periderma cicatricial do hospede (Est. 25, *D-E, c*). As lesões produzidas com as inoculações da cultura da forma imperfeita apresentam-se identicas ás que acabamos de descrever (Est. 25, *D-F*).

A estrutura do fungo nas lesões produzidas com culturas monoascosporicas de *Elsinoë australis* é portanto caracteristica da forma imperfeita desse fungo, o que estabelece definitivamente as relações metagenéticas entre as duas formas.

## LIFE HISTORY OF "ELSINOË AUSTRALIS", CAUSE OF SWEET ORANGE FRUIT SCAB.

### *Abstract*

*This paper reports in detail a life history study of Elsinoë australis, the causal fungus of sweet orange fruit scab, which attacks sweet oranges and certain other citrus fruits, and which is still of more or less limited distribution in certain citrus-growing regions of southern South America. The paper shows definitely the connection between the earlier discovered imperfect or Sphaceloma stage and the perfect stage, which was discovered in 1936, and identified as of the genus Elsinoë. The life history is shown by a series of photographs demonstrating the different steps in the proof of the genetical connection of the two stages. The research is based particularly on the type specimen (1936), but also on the only other specimen (1937) showing the perfect stage, that has been discovered.*

*In connection with a general morphological description of the perfect stage, there are shown immature ascomata, separate asci and ascospores.*

*Ascospores from the type specimen in single spore cultures were germinated in water drops, and on the surface of a drop of potato-*

*dextrose-agar on glass slides. In water the ascospores promptly produced conidia which germinate by means of germ tubes. In some instances, within a 24-hour period after the beginning of the experiment, the length of these tubes was more than 20 times that of the conidia. In the water culture the conidia soon became detached. In one experiment, however, where evaporation reduced the amount of water to a film surrounding the ascospore the conidia remained attached to the ascospores and germinated in situ. On the agar substrate the ascospores germinated by means of germ-tubes, which were produced from each cell. Those branched rapidly forming in a few days a spherical thallus with hyphae extending bristle-like from the surface.*

*Microscopic sections of acervuli and underlying tissue of the type specimen were made and these were placed in a drop of potato-dextrose-agar medium on a glass slide. In a 24-hour period new hyphae had been produced from the acervuli and the part of the underlying portion of the lesion without the phellem. They were noticeably absent from the tissue within the phellem, which is not invaded by the fungus. As observed at close intervals the further development of thalli from these cultures was essentially the same as that from the ascospores. Several thalli from cultures from both these sources were transferred to tubes of potato-dextrose-agar medium where they produced cultures of practically identical appearance.*

*In order to further prove the genetic relation between the two stages inoculations were made (1936-8) in the field with the cultures just mentioned on young fruit of three varieties of sweet orange, Abacaxí, Pera, and «lima» and on «laranja cravo» (Citrus nobilis var.). The results were as follows:*

*Single ascospore culture: Total number of inoculations 68, positive cases 52, percentage 77 %.*

*Imperfect stage culture: Total number of inoculations 24; positive cases 19, percentage 79 %.*

*Controle: Total number 60, positive cases 1, percentage 1.6 %.*

*Two cultures from the type specimen, a single ascospore culture, and a culture from a microsection of an acervulus, and a reisolation culture were compared in parallel cultures on potato-dextrose-agar with 11 earlier isolates including a saltation of each of the three previously reported groups (Group 1 or viscous, group 2 or black, group 3 or velvety). This comparison showed that the 3 new cultures were all of group 2. A previously observed growth type represented by 3 isolates of 1935 included in the present comparison was designated as group 4 or reddish.*

*The experimental lesions obtained by artifical inoculations showed fructifications characteristic of the imperfect stage, with anatomical structure identical with that observed in natural lesions.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — Bitancourt, A. A., e Anna E. Jenkins — 1936 — Perfect stage of the sweet orange fruit scab fungus. *Mycologia,* 28: 489-492.

2 — Bitancourt, A. A., e Anna E. Jenkins — 1936 — Variações de Elsinoe australis Bitancourt e Jenkins. *Rodriguesia* 2 (Numero especial. Annaes da Primeira reunião de Phytopathologistas do Brasil): 315-317, 1936 (1937).

3 — Bitancourt, A. A., e Anna E. Jenkins — 1937 — Sweet orange fruit scab caused by Elsinoe australis. *Journ. Agric. Res.* 54: 1-18.

4 — Bitancourt, A. A., e Anna E. Jenkins — 1939 — Novas especies de Elsinoe e Sphaceloma sobre hospedes de importancia economica. *Prim. Reun. Sul-Americana de Botanica* (Rio de Janeiro). No prélo.

5 — Jenkins, Anna E. — 1931 — Scab of Canavalia caused by Elsinoe canavaliae. *Journ. Agric. Res.,* 42: 1-12.

6 — Jenkins, Anna E. — 1931 — Lima-bean scab caused by Elsinoe. *Journ. Agr. Res.,* 42: 13-23.

7 — Jenkins, Anna E. — 1933 — A Sphaceloma attacking navel orange from Brazil. *Phytopath.,* 23: 538-545.

8 — Jenkins, Anna E. e A. A. Bitancourt — 1939 — Ilustrações das doenças das plantas causadas por Elsinoe e Sphaceloma conhecidas na America do Sul até Janeiro de 1936. *Arq. do Inst. Biologico,* S. Paulo, 10: 31-60.

9 — Winston, J. R. — 1923 — Citrus scab: its cause and control. *U. S. Dept. Agric. Bull.* 1118. 39 pp. ilus.

10 — Woronichin, N. N. — 1914 — Plectodiscella piri, der Vertreter einer neuen Ascomyceten- Gruppe. *Mycol. Centbl.* 4: (225)-233.

———o———

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 17

*Elsinoë australis. A,* lesão, na laranja Baía madura, do especimen tipo, Estado de São Paulo, 1936; *a,* numerosos ascomas que se mostram como massas erumpentes redondas, de coloração clara sobre o fundo escuro da forma imperfeita (*b*); *c,* tecido doente do hospede × 44. *B,* ascoma proeminente (*a*) envolvido da forma imperfeita mais escura (*b*), × 138. *C.* Parte de uma lesão em laranja «tangerina» madura, Montenegro, Rio Grande do Sul, 1937; *a,* ascomas, *b,* forma imperfeita; *c,* tecido do hospede, × 44. Conforme está explicado no texto, as lesões representadas em *A* e *C* parecem corresponder ao que, em cultura, foi designado como raça preta ou grupo II e raça viscosa ou grupo I, respectivamente. *D-G,* Ascomas do especimen tipo. *D-E,* Ascomas novos (*a*), na mesma pustula de que a forma imperfeita (*b*); *c,* parede externa da epiderme rôta; *d,* tecidos do hospede, por baixo da frutificação, × 500. *F* e *G,* ascomas mais velhos e proeminentes (*a*) com alguns ascos (*b*); *c,* forma imperfeita; *d,* tecido subjacente do hospede; *e,* parede superior rôta, da epiderme. × 500. *H.* Asco monosporico representado em *G, b; a,* parede externa fina; *b,* parede interna espessa; *c,* ascosporo. × 1000. *I-M.* Frutificações de *C; I-J* e *L-M,* estromas contendo ascos (*a*) ou restos (parede externa) de ascos (*M, a*); *K,* asco isolado mostrando a região apical mais espessa e ascosporos septados, *b; a,* possivelmente, parte rôta e destacada da parede externa do asco. × 500. *N,* ascosporo isolado, × 1000. Todas as secções representadas de *D* a *N* estão montadas em lactofenol, sem coloração.

Fot. A. A. Bitancourt.

### Estampa 18

*Elsinoë australis,* do especimen tipo. *A-C.* Produção de conidias por brotação de ascosporos em gota de agua, nos seguintes intervalos: 30 minutos (*a*), (faltando para *C*), duas horas (*b*), 5 horas 1/2 (*c*) e 24 horas (*d*) Culturas feitas em 18 de Agosto de 1936. A conidia visivel em *A-b,* já se achava destacada em *A, c;* em *A, d,* duas novas conidias brotaram da celula mediana inferior do ascosporo, tendo uma delas germinado *in situ.* Das duas conidias visiveis em *B, b,* uma ainda permanece presa ao ascosporo em *B, c,* vendo-se em *B, d,* o seu desenvolvimento ulterior. Do ascosporo bicelular *C, b,* brotaram duas conidias, permanecendo uma delas ainda presa em *C, c.* Em *C, e,* uma das conidias destacada do ascosporo mostra-se germinada. Nota-se que os ascosporos se dilataram sensivelmente em *A, d,* e *C, d.* Tudo × 500. *D, a* e *b,* o mesmo que *A, c* e *B, c,* respectivamente, vendo-se melhor em *D, b,* a celula apical vasia (*c*) e as duas celulas medianas e o conidio que apresentam pontos refrigentes. × 1000. *E,* Conidias brotadas de *A* e *C,* e germinadas no fim do periodo de 24 horas. × 500. *F,* o mesmo que *A,* mostrando outros ascosporos depois de 2 horas (*a-c*) e depois de 24 horas (*d* e *e*). Conforme se explica no texto, *d* e *e* representam a germinação, *in situ,* em atmosfera húmida, das conidias brotadas dos ascosporos inicialmente colocados em gota d'agua × 500. Em *F, e,* podem-se contar 6 conidias produzidas no ascosporo, na sua maioria germinando *in situ.* *G.* Outros ascosporos da mesma experiencia depois de 2 horas (*a-d*) e depois

de 24 horas *(e-h)*. × 500. *H-J*. Microculturas da forma imperfeita em batata-dextrose-agar, depois de dois dias (1 a 3 de Agosto de 1936). Pequenas culturas de tecidos de secções de acervulo ou esporodoquio, vendo-se a produção de novas hifas ou conidióforos, no prazo de 2 dias; *a*, frutificação conidiana do material inicial; *b*, novos elementos formados a partir de *a*; *J*, *c*, conidia destacada, agora provida de um septo, formada durante o periodo de 2 dias; × 265. *K, L, M*, as mesmas culturas com 3 dias. × 265. Nota-se que não ha brotação na parte inferior, isto é, mais profunda, das secções.

Fot. A. A. BITANCOURT.

Estampa 19

*Elsinoë australis*. *A-D*, germinação e desenvolvimento em substrato de batata-dextrose-agar, de 4 ascosporos diferentes, provenientes de uma mesma lesão do especimen tipo, isolados em 6 de Agosto de 1936. Em cada caso, *a* (falta para *B*), representa o ascosporo original, logo após ter sido colocado no meio de cultura (× 265 e × 530); *b*, germinação depois de 24 horas (× 265 e × 530); *c*, desenvolvimento após 48 horas (× 265); *d*, depois de 4 dias (× 265) *e*, (falta para *A* e *B*) depois de 6 dias (× 100). Nota-se que, embora proveniente de um ascosporo aparentemente identico aos de *A*, *B* e *C*, o desenvolvimento de *D* mostrou-se desde o inicio notavelmente diferente dos outros 3 esporos da mesma lesão. Em *C*, *e*, e *D*, *e*, o talo compacto já se tornou opaco na parte central que por esse motivo se mostra completamente preta na fotografia.

Fot. A. A. BITANCOURT.

Estampa 20

Comparação entre 8 culturas iniciais de tecido da forma imperfeita de *Elsinoë australis (A* e *B)* e dez culturas monoascosporicas iniciais do mesmo fungo (*C* e *D*), todas provenientes do especimen tipo. *A*, *a-h*, culturas com 39 dias, iniciadas em 1 de Agosto de 1936 com tecido da forma imperfeita conforme está representado para 3 delas na estampa 18, *H-J*. Todas as culturas tiveram o seu desenvolvimento inicial a partir do tecido da forma imperfeita examinado dia a dia até a transferencia para os tubos representados em *A*. × 1. *B*, as mesmas culturas com 69 dias. × 1. *C*, culturas com 34 a 37 dias, iniciadas de um ascosporo entre 3 e 6 de Agosto de 1936, conforme está representado para os ascosporos das culturas *f*, *h* e *i*, na estampa 19, *C*, *A* e *B* respectivamente. Todos os ascosporos das outras culturas tiveram igualmente o seu desenvolvimento observado ao microscopio, dia a dia, até a sua transferencia para os tubos representados. Numerosos talos secundarios são visiveis nas culturas *a* e *b*. × 1. *D*, as mesmas culturas com 64 a 67 dias. × 1. *E*, conidias produzidas numa cultura secundaria proveniente de uma cultura monoascosporica. × 500.

Fot. A. A. BITANCOURT.

Estampa 21

*Elsinoë australis*. Infecções resultantes de inoculações artificiais com a cultura monoascosporica 579 C (Estampa 20, *C*, *a*) e com a cultura de tecido da forma imperfeita 577 C (Est. 20, *A*, *g*) *A*, laranja abacaxi, nova, inoculada em 26 de Outubro de 1936 com a cultura 577 C e colhida e fotografada depois de 38 dias. × 3. *B-E*, laranjas lima, novas, inoculadas de 10 a 13 de Novembro de 1936 com a cultura 577 C (*B* e *E*) e a cultura 579 C (*C* e *D*) e colhidas e fotografadas depois de 32 dias aproximadamente. *C*, fruta com forte infec-

ção. × 2. Das frutas *A* e *C* foram isoladas as culturas representadas na estampa 22, *E* e *B* respetivamente. *F* e *G*, laranjas lima inoculadas com a cultura 579 C *(F)* e 577 C *(G)* em 7 de Novembro de 1936 e deixadas no pé durante quasi 7 mêses, quando foram fotografadas; *a*, lesões primarias grandes; *b*, numerosas lesões secundarias, ×1. *H*, 5 frutas de laranja lima inoculadas com a cultura 579 C (monoascosporica) entre 20 e 28 de Outubro de 1937, e colhidas e fotografadas em 16 de Dezembro de 1937. A fruta maior apresenta numerosas lesões secundarias, pequenas, × 1. *I*, laranjas abacaxí inoculadas com a cultura 579 C em 23 e 25 de Novembro de 1938 e colhidas em 10 de Janeiro de 1939. As lesões primarias resultantes da inoculação de frutas mais desenvolvidas do que nos casos anteriores, são pequenas como as lesões secundarias dos referidos casos. × 1.

Fot. BITANCOURT e RODRIGUES.

Estampa 22

*A-F*, culturas iniciais com 35 a 38 dias em tubos de batata-dextrose-agar inclinado, de reisolamentos de *Elsinoë australis* feitos de 12 a 15 de Dezembro de 1936, a partir de frutas novas inoculadas, de que algumas foram representadas na estampa 21, *A-E*. *A*, cultura isolada de tecidos da forma imperfeita de lesões de uma laranja pêra inoculada em 3 de Novembro de 1936. *B*, id. da laranja lima representada na estampa 21, *C*. *C*, id. de uma laranja cravo inoculada em 16 de Novembro de 1936. *D*, id. de uma laranja pêra inoculada em 5 de Novembro de 1936. *E*, id. da laranja abacaxí representada na estampa 21, *A*. *F*, id. de laranja lima inoculada em 11 de Novembro de 1936. As culturas *A-D* foram isoladas de partes inoculadas com a cultura 579 C; *E* e *F*, de frutas inoculadas com a cultura 577 C. *G-N*, comparação em caixas de Petri contendo meio de batata-dextrose-agar (Formula C) de subculturas com 35 dias, provenientes das culturas *A (G)*, *B (I)*, *C (J)*, *D (H)*, *E (K)* e *F (L)*, juntamente com subculturas de 579 C *(M)* e 577 C *(N)*. Tudo × 1.

Fot. A. A. BITANCOURT.

Estampa 23

*Elsinoë australis*. Comparação cultural paralela das duas culturas 557 C e 579 C do especimen tipo, representando respetivamente uma cultura de tecido da forma imperfeita e uma cultura monoascosporica e tambem a cultura 759 C, reisolação de uma inoculação com 579 C, representada na estampa 22, *A*, e *G*, com diversas culturas de diversas proveniencias; a ordem das culturas, a sua origem e os grupos (I-IV) em que são convenientemente classificadas estão relacionados na tabela 2. *A*, *a-n*, em meio de batata-dextrose-agar (formula B, ver nota 3, p. 134). *B*, *a-n*, as mesmas culturas, no mesmo meio, preparado de acordo com a formula C. *A* e *B*, na temperatura do laboratorio em São Paulo. *C*, *a-n*, e *D*, *a-n*, culturas correspondentes a *A*, *a-n* e *B*, *a-n*, respetivamente, desenvolvidas á temperatura de 32° C. Todas as culturas têm 32 a 33 dias. Fotografias em 27 de Dezembro de 1937. ×1.

Fot. A. A. BITANCOURT.

Estampa 24

*Elsinoë australis*. Culturas em caixas de Petri em meio de batata-dextrose-agar preparado de acordo com a formula C (ver nota 3, p. 134). As culturas são as mesmas da estampa 23 e colocadas na mesma ordem, ou seja a da

tabela 2, estando a cultura 759 C representada duas vezes (*C* e *D*). *C* e *G* se desenvolveram na temperatura de 32° C; as outras, na temperatura do laboratorio, em São Paulo. Nesta estampa, *G, H, I* e *O* representam o grupo I, *A-F*, o grupo II, *M* e *N*, o grupo III e *J-L*, o grupo IV. $^1/_3$ tamanho natural.

Fot. A. A. BITANCOURT.

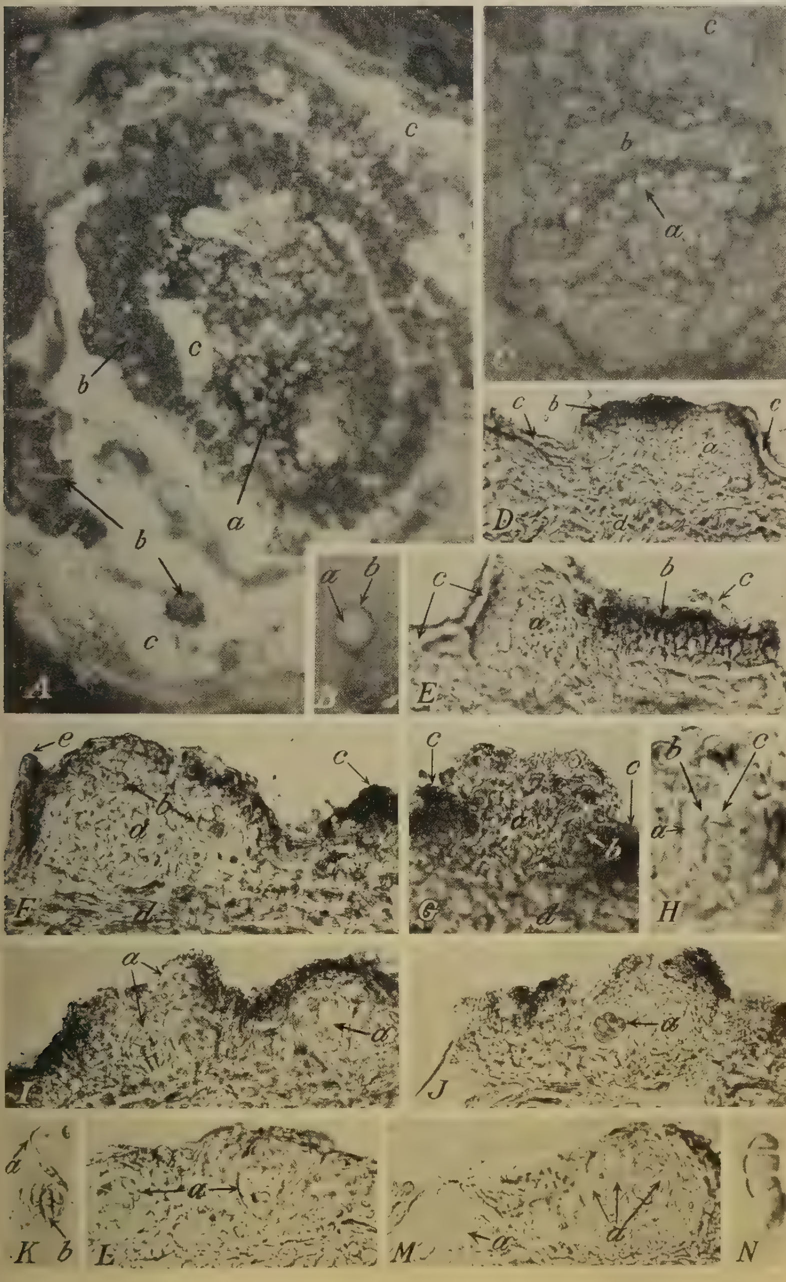
Estampa 25

Frutificações conidianas de *Elsinoë australis* em lesões resultantes de inoculação artificial em laranja lima com (*A-C*) a cultura monoascosporica 579 C. isolada do especimen tipo, e (*D-F*) a cultura de tecido da forma imperfeita 577 C do mesmo especimen. *A* e *B*, da fruta representada na Estampa 21, *C*. 35 dias depois da inoculação; *C*, de outra fruta 203 dias depois da inoculação; *D* e *F*, da fruta representada na Estampa 21, *G*, 205 dias depois da inoculação. *A, a*, parede superior das células epidérmicas; *b*, hifas hialinas ou pseudo-parenquima; *c*, extremidades de conidióforos levemente salientes acima da epiderme; *d*, tecido do hospede (da lesão). *B, a*, parede superior das celulas epidermicas, *b*, hifas hialinas; *c*, tecido do hospede (da lesão). *C, a*, palissada de conidióforos, *b*, pseudo-parenquima intraepidermico; *c*, parede externa da epiderme; *d*, tecidos do hospede (da lesão). *D-F*, *a*, palissada de conidióforos, *b*, pseudoparenquima subjacente, *c*, prosenquima, *d*, parede externa da epiderme. Tudo × 500.

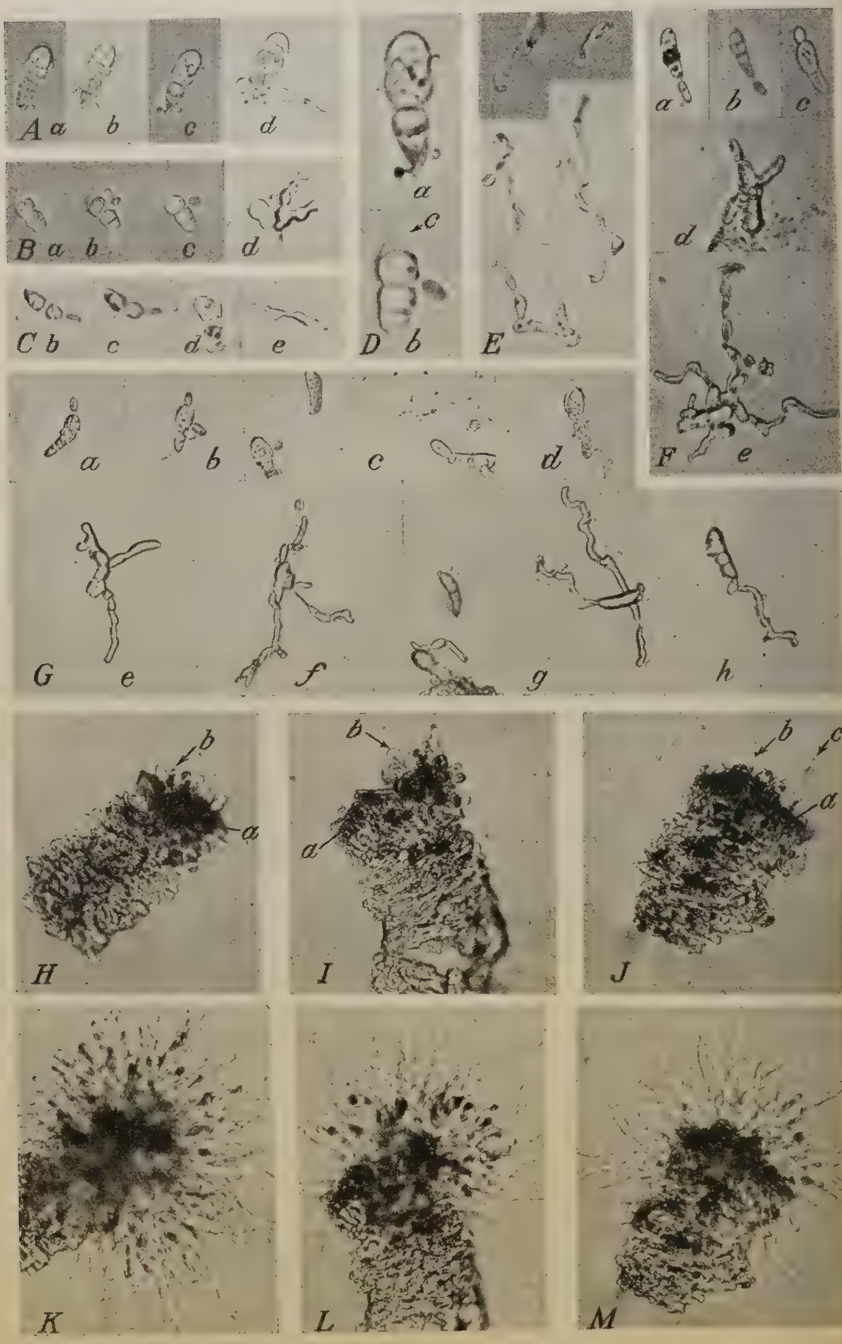
Fot. A. A. BITANCOURT.

———o———

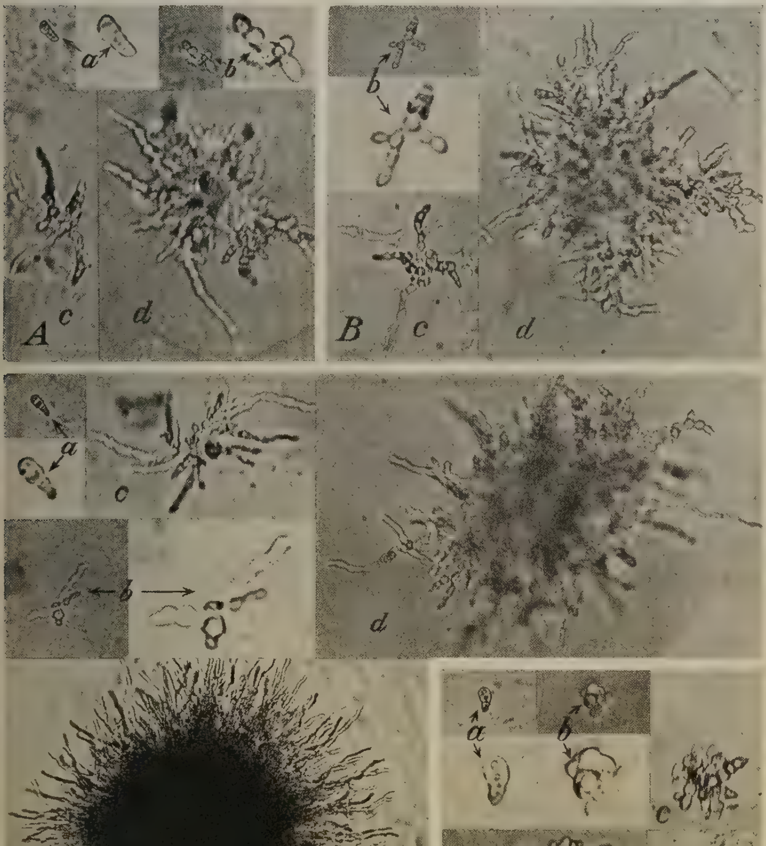
Estampa 17



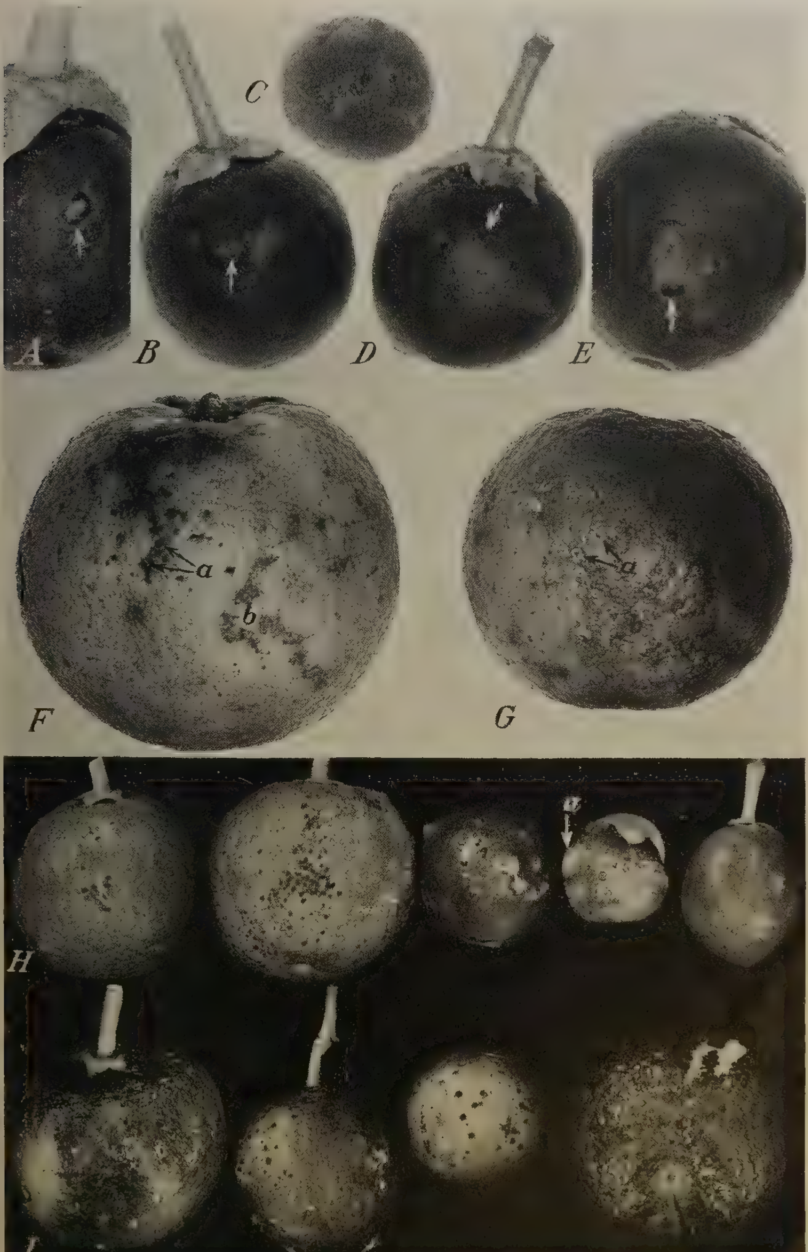
Estampa 18

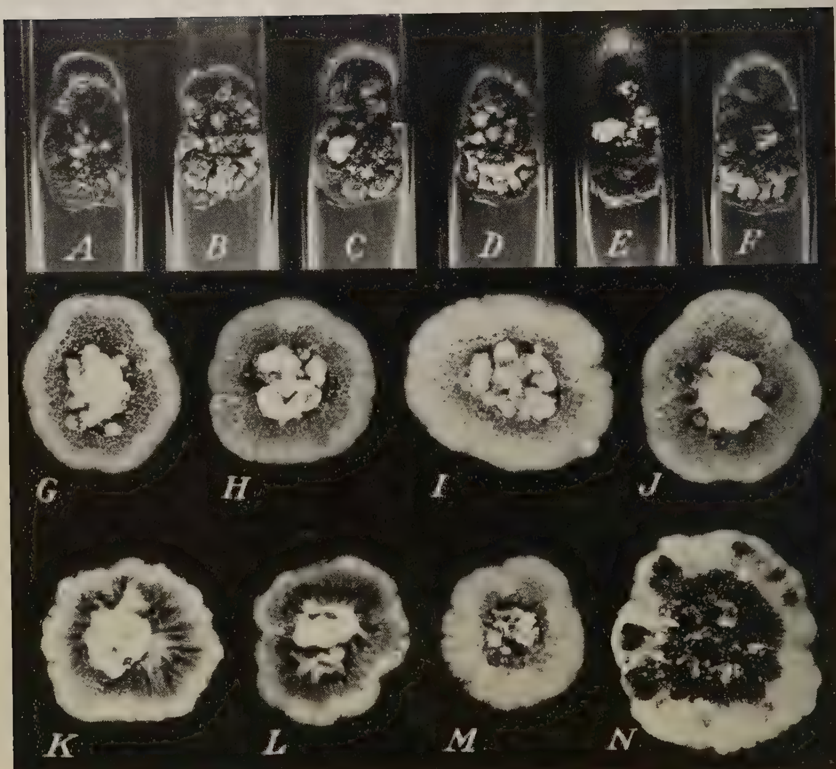


Estampa 19




A a
b
c
d
e
f
g
h
B a
b
c
d
e
f
g
h
C a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
a
D b
c
d
e
f
g
h
i
j
E

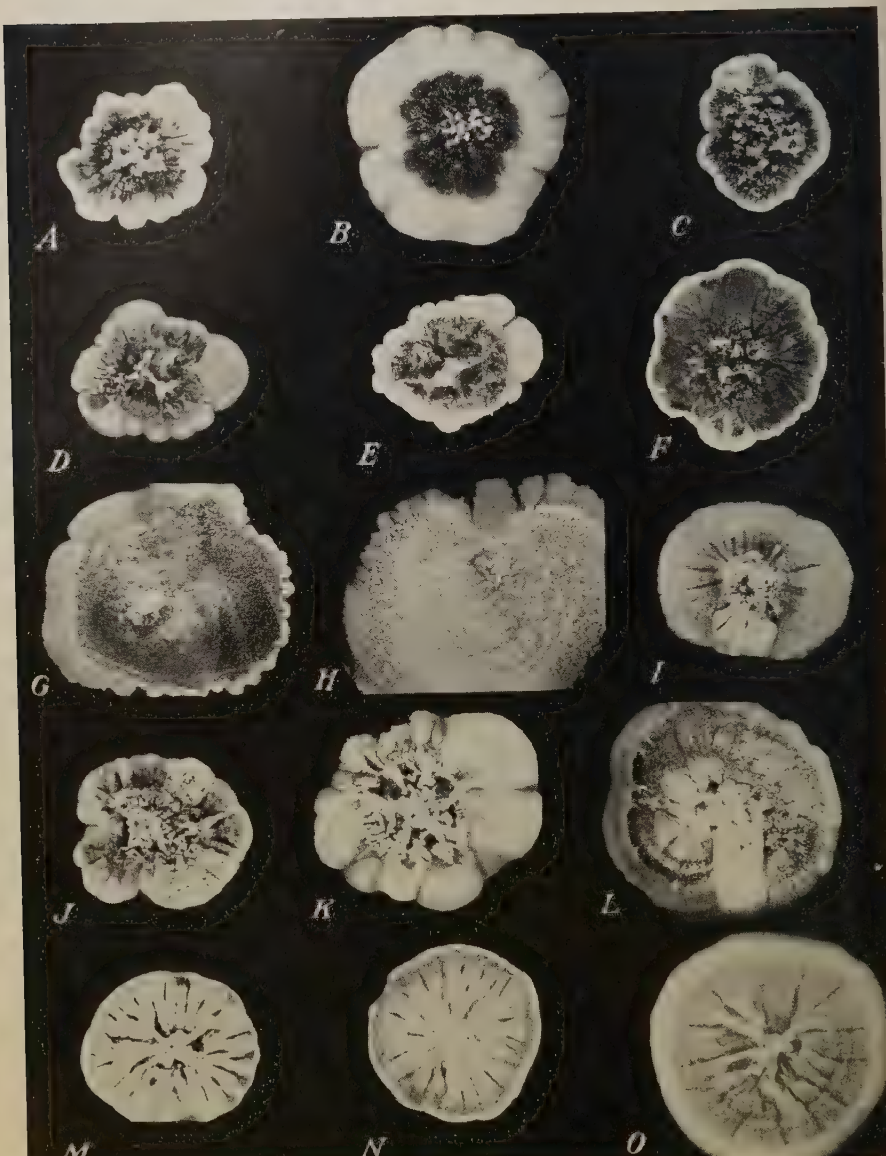

A
B
C
D
E
a
b
F
a
G
H
I

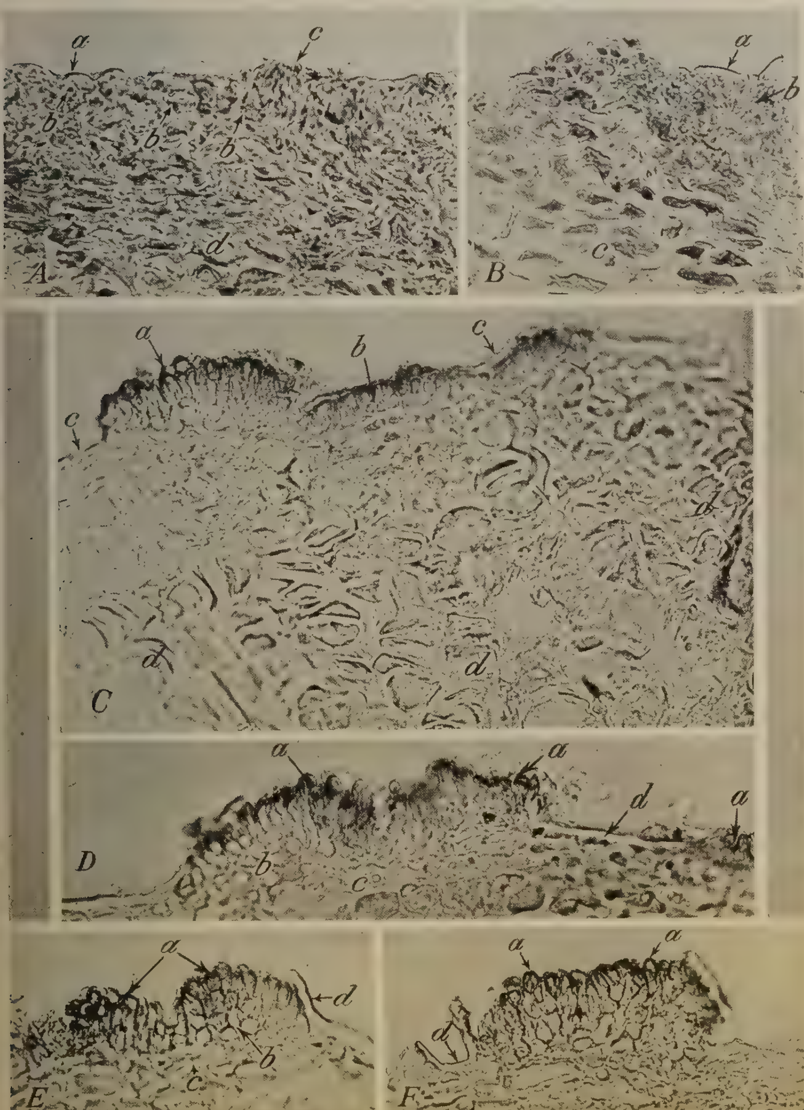

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N

Estampa 23



Estampa 24




A
B
C
D
E
F

# ALGUNS PARASITAS DE "GALLUS GALLUS (L.)" VERIFICADOS EM SÃO PAULO

POR

J. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto e estampa 26

Ectoparasitas de grupos e especies varias são comumente encontrados nos galinaceos que chegam para exame á Secção de Ornitopatologia do Instituto Biologico. Alguns dêles já foram ha alguns anos referidos pelo dr. ZEFERINO VAZ, em trabalho publicado nesta revista.

Em nossa rotina de trabalho consideramos com particular interesse os parasitas que se apresentam associados a qualquer manifestação patológica da qual possam ser agentes.

A presente nota apenas trata de alguns achados que julgamos interessante referir, e que dizem respeito aos itens seguintes: 1. observação de sarna produzida pela *Rivoltasia bifurcata.* 2. verificação de *Dermanyssus gallinae* como parasita de galinhas. 3. ocorrencia de *Laminosioptes cysticola* em São Paulo.

Estas observações foram feitas em material constante de 6553 aves examinadas em nosso laboratorio.

## 1. Sarna produzida pela *Rivoltasia bifurcata.*

Contrastando com a grande frequencia da sarna das patas, produzida por *Cnemiodocoptes mutans* (ROBIN e LANQUETIN, 1853), especialmente nas criações rusticas, são rarissimas entre nós outras formas de sarna.

Desconhecemos em nossa literatura referencia ao achado de qualquer das variedades de *Cnemiodocoptes laevis,* parasita que jamais encontrámos no material por nós examinado. SILVIO TORRES refere-se a esse parasita em artigo geral sobre sarnas e pediculoses de aves domesticas em Pernambuco, mas desse artigo não é possivel concluir si o parasita foi ou não observado por ele.

Sarna benigna, não pruriginosa, é produzida por certos epidermoptineos que vivem muito superficialmente na pele, onde não cavam galerias, infiltrando-se e pululando apenas na camada ceratinizada do epitelio. Tal sarna foi por nós apenas tres vezes observada em S. Paulo: duas vezes produzida por *Epidermoptes bilobatus* RIVOLTA, 1876, casos já referidos (9), e uma vez pela *Rivoltasia bifurcata* (RIVOLTA, 1876). Este ultimo parasita distingue-se facilmente do primeiro pela ausencia

de unhas nos tarsos e tambem pela extremidade caudal dos machos, que é muito caracteristica. E' curioso notar que a figura que RIVOLTA e DELPRATO dão, deste parasita, em seu livro classico, representa erradamente os lobulos caudais do macho, pois que os mostra desprovidos de uma grande asa membranosa, extremamente delicada e por isso mesmo dificil de vêr-se. Apresentamos um desenho dessa asa, no qual procuramos fixar, como melhor pudemos, as suas relações com o esqueleto do lobulo e os espinhos; alguns desses detalhes são mais bem observados em campo escuro. Alguns autores recentes dão desses processos caudais descrição satisfactoria, como por exemplo NEVEU-LEMAIRE, que os refere como laminas delicadas e transparentes, estreitas na frente e dilatadas atrás ao nivel da extremidade de cada lobulo, que elas ultrapassam para inserir-se no bordo externo.

Os ovos desta especie apresentam, na casca, apêndice curioso em forma de âncora.

2. *Dermanyssus gallinae* em galinhas.

*Dermanyssus gallinae* (de GEER, 1778) e *Liponyssus* (BERLESE, 1888) são ectoparasitas que costumam substituir-se um ao outro nos galinheiros, conforme a região do mundo. Assim, segundo WOOD, o liponisso é proprio dos tropicos e o dermanisso das regiões frias. Na Africa, a julgar pelo catalogo de BEDFORD, domina o liponisso.

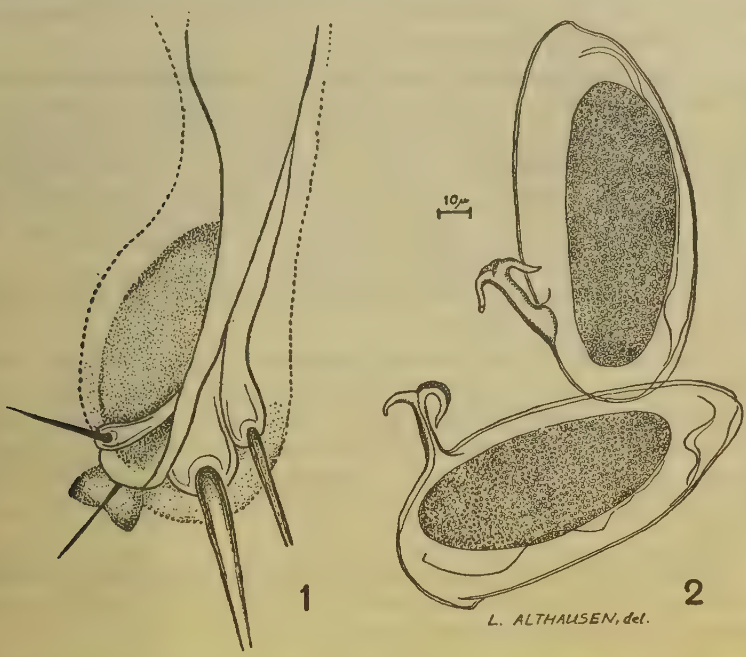
Entre nós ha muito vimos observando de modo sistematico os dermanissideos que ocorrem em nossas galinhas e pudemos confirmar a opinião de FONSECA, de que *Liponyssus bursa* é parasita que entre nós ocorre predominantemente. Até muito recentemente não se havia assinalado com precisão o *Dermanyssus gallinae* entre nós; é verdade que LUTZ ha muitos anos referiu como frequente esta ultima especie, mas da leitura de seu trabalho não se pode concluir com segurança si foi ou não afastada a possibilidade de se tratar do liponisso.

Ha algum tempo, entretanto, tivemos a atenção despertada para os dermanissideos de nossos pássaros domesticos e que, por seus habitos, mais se aproximavam dos dermanissos que dos liponissos (8); o exame desses parasitas logo revelou tratar-se de especie do genero *Dermanyssus,* que o dr. FLAVIO DA FONSECA, a quem demos material, classificou de *D. gallinae,* publicando sobre isso uma pequena nota (3). Os habitos dos dermanissos são de fato muito mais metodicos que os dos liponissos, correspondendo perfeitamente aos do carrapato dos galinheiros *(Argas persicus):* durante o dia a ave não é molestada pela acariano, que se esconde nas frestas da gaiola e em cavidades diversas; costumam fazer grandes colonias dentro da dobradiças das portas, em geral constituida por helice de arame; sua presença aí é, entretanto,

traída pela grande quantidade de excrementos, que sob forma de pontilhado branco e preto, fica á entrada do esconderijo.

Mais recentemente ainda, tivemos oportunidade de observar, duas vezes, a ocorrencia de *Dermanyssus gallinae* nos proprios galinheiros, parasitando galinhas. As verificações foram feitas na cidade de São Paulo, tratando-se em ambos os casos de infestações muito intensas.

A questão pode ser assim resumida no momento: em São Paulo ocorrem, parasitando galinhas, tanto o *Dermanyssus gallinae* quanto o *Liponyssus bursa,* sendo este ultimo o parasita predominante. Nos passaros de gaiola, até o presente, parece mais comum o *Dermanyssus gallinae.*




*Rivoltasia bifurcata.* Fig. 1 - Lobulo caudal do macho. Desenho esquematizado. A formação semelhante a ventosa parece dobra da membrana. Fig. 2 - Ovos.

### 3. Ocorrencia de *Megninia ginglymura.*

Apenas duas vezes observamos infestação intensa por *Megninia,* sendo *M. ginglymura* (Megnin) a especie em causa. As aves parasitadas provinham, uma de Jacareí e outra da cidade de São Paulo, sendo ambas da raça *Rhode-Island Red.* Num dos casos, em que a infesta-

ção era particularmente intensa e não havia concomitancia de nenhum outro ectoparasita, pudemos apreciar bem a natureza dos estragos produzidos por esse analgesideo, os quais se observam nas penas, especialmente do dorso, perto do uropigio. Essas penas apresentam-se roidas, com as bárbulas cortadas ou rarefeitas, como se vê em aves intensamente parasitadas por malófagas. Além disso, os foliculos das penas mostram-se inchados e vermelhos, e o canhão recoberto de detritos no ponto em que começa a haste. Quanto á saúde da ave, não apresenta o menor comprometimento.

As megninias são facilmente perceptiveis quando se examinam as penas com lente ou microscopio entomologico: ativamente moveis, percorrem com certa rapidez as bárbulas, mostrando certa tendencia a buscar sempre a haste da pena.

Quanto aos caracteres morfologicos, o parasita assinalado entre nós concorda perfeitamente com as descrições classicas encontradas nas obras especializadas. E' caracteristica de *Megninia cubitalis* (MEGNIN) a extremidade posterior do macho, com dois lobulos segmentados; *M. ginglymura* (MEGNIN), que para muitos autores é mera variedade de *M. cubitalis,* desta se distingue pelos epimeros anteriores, que não se fundem em Y, mas são apenas contiguos.

*M. ginglymura* tem sido geralmente observada em perú, faisão, e pavão, mas não em galinha.

Não são comuns na literatura ornitopatologica referencias á ação deleteria de parasitas do genero *Megninia.* LAHAYE refere que a proliferação muito grande de *M. columbae* (BUCHHOLZ, 1870) pode acarretar a morte de alguns pombos em consequencia da irritação produzida. Quanto a *M. cubitalis,* afirma que, associada a *Epidermoptes bilobatus,* pode, em certos casos, provocar intenso prurido e mesmo sintomas nervosos.

WICKWARE observa, no Canadá, curiosa sarna das patas produzida por *M. gallinulae* (BUCHHOLZ), clinicamente diversa da sarna classica produzida por *Cnemiodocoptes mutans.*

Segundo LAHILLE, *M. columbae* provoca engrossamentos epidermicos circulares na base das penas da cabeça e do pescoço, em pombos. ZÜRN faz referencia a uma «Federmilbe», cujo nome zoologico não dá, e cuja enorme proliferação teria acarretado morte do pombo parasitado, em condição de extrema magreza; esse parasita deveria ser identificado, segundo NEVEU-LEMAIRE, a *M. columbae.* BISHOP e WOOD, que nos Estados Unidos assinalaram a presença de *M. cubitalis* em perú, associada a *Freyana chanayi* TROUES., não atribuem a nenhum dos parasitas ação deleteria aparente.

4. Ocorrencia de *Laminosioptes cysticola*

Formações calcareas, de tamanho variavel, porém geralmente não excedendo 1 ou 2 milimetros, são achadas frequentemente no tecido conjuntivo subcutaneo de galinhas, entre nós. Entretanto o encontro de *Laminosioptes cysticola* (Vizioli, 1868), associado a tais formações, é rarissimo. Conhecemos apenas, no Brasil, a referencia de Urbain. Em nossa experiencia apenas uma unica vez, muito recentemente, pudemos demonstrar a presença do ácaro, assim mesmo em quantidade minima.

SOME PARASITES OF "GALLUS GALLUS (L.)" OBSERVED IN THE STATE OF S. PAULO.

*Abstract*

*The author reports the occurrence of four parasites in the domestic fowl, in the State of São Paulo, Brazil.*

*Rivoltasia bifurcata is now for the first time recorded in Brazil; it causes a mild type of mange in pullets. Some details are given of the posterior lobes of the male of this parasite.*

*Dermanyssus gallinae, which in Brazil is usually found as a parasite of cage-birds, was for the first time demonstrated to occur as a fowl parasite. The common fowl mite in Brazil is Liponyssus bursa.*

*Heavy infestations by Megninia columbae have been found twice in 6553 birds examined. The author describes the damages caused by this feather mite, which are quite similar to the ones caused by the common lice.*

*Although some calcareous formations resembling those ascribed to Laminosioptes cysticola are frequently met with in post-mortem examination of birds, only once has this parasite been found by the author associated with such formations.*

BIBLIOGRAFIA

1 — Bedford, G. A. H. — 1934 — A synoptic check-list and host list of the ectoparasites found on South African Mammalia, Aves and Reptilia. *18th. Rept. of the Dir. of Vet. Serv. and An. Ind., Un. of South Africa,* pp. 223-523.

2 — Bishop, F. C. e Wood, H. P. — 1926 — Mites and lice on poultry. *U. S. Dept. Agric. Farmer's Bul., n.º* 801, pag. 7.

3 — Fonseca, F. — 1938 — Notas de acareologia — *Boletim Biologico,* São Paulo, 3 (3/4), pp. 172.

4 — Lahaye, J. — 1928 — *Maladies des volailles.* Impr. Steinmetz-Haenen, Remouechamps, Belgica., pp. 330-331.

5 — LAHILLE, F. — 1920 — Enumeracion sistematica de los pedicúlidos, malófagas, pulicidos, linguatúlidos y ácaros (1.ª parte) encontrados en la Republica Argentina. *Min. de Agricultura, Dir. de Laborat. e investigaciones agricologanaderas.* Buenos Aires, pag. 27.
6 — LUTZ, A. — cit. em REIS e NOBREGA.
7 — NEVEU-LEMAIRE, M. — 1938 — *Traité d'Entomologie médicale et vetérinaire.* Vigot-Frères, Paris, pag. 278.
8 — REIS, J. — 1938 — Doenças e pragas dos pássaros. — *O Biologico,* S. Paulo, 4, 67-71.
9 — REIS, J. e NOBREGA, P. — 1936 — *Tratado de Doenças das aves.* — ed. Instituto Biologico, S. Paulo, pp. 357-361.
10 — RIVOLTA, S. e DELPRATO, P. — 1880 — *L'Ornitojatria.* Uebelhart, Pisa.
11 — TORRES, S. — 1938 — Sarnas e pediculoses das aves domesticas. *Bol. Sect. Agric. Ind. e Com.,* Pernambuco, 3, 1-10.
12 — URBAIN — cit. em REIS e NOBREGA.
13 — VAZ, Z. — 1935 — Ectoparasitas de animais domesticos observados no Estado de S. Paulo. *Arquivos do Inst. Biologico,* S. Paulo, 6, 29-33.
14 — WICKWARE, A. B. — 1921 — An unusual form of scabies in fowls. *Journ. Paras.,* 8, 90-91.
15 — WOOD, H. P. — 1920 — Tropical fowl mite in the U. States. *U. S. Dept., Agric., Dept. Circ.* n.º 79.
16 — ZÜRN, — cit. em Neveu-Lemaire.

## EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 26

Figs. *A* e *B* — Pena de ave parasitada por *Megninia* — Tamanho natural e detalhe.

Estampa 26



A



B

Vol. 10 — Art. 9 Setembro de 1939

# TWENTY NEW BRAZILIAN TINGITIDAE (HEMIPTERA) (PART V)*

BY

C. J. Drake and E. J. Hambleton

Iowa State College, Ames, Iowa, U. S. A. and Instituto Biologico, São Paulo

The present paper contains the description of 20 new lace bugs and is the fifth list (**) of a series of articles dealing with the *Tingitoidea* of the United States of Brazil. Unless otherwise stated the specimens were collected by E. J. HAMBLETON and H. F. G. SAUER. The holotypes and allotypes are in the DRAKE collection, paratypes in the collections of both authors.

## 1. *Teleonemia jubata*, sp. nov.

Allied to *T. brevipennis* CHAMPION, but differs in having slightly smaller hood and being lighter in color, the lateral carinae distinctly converging posteriorly. Rostral channel deep, open behind; laminae foliaceous, areolate, testaceous; rostrum long, black at apex, almost reaching end of channel. Antennae moderately long, closely, and shortly pilose, testaceous, the third segment becoming darker towards apex, the fourth black; segment III a little less than three times as long as IV. Carinae foliaceous, uniseriate, the areolae small; lateral carinae slightly bowed within in front, strongly converging behind. Hood rather small, inflated, slightly projecting forward in front. Paranota narrow, uniseriate, reflexed against the pronotum. Legs yellowish brown, the tarsi dark. Elytra yellowish brown, the areolae mostly embrowned, some of them dark fuscous, costal area narrow, mostly uniseriate, biseriate in widest part, the areolae mostly hyaline; subcostal area mostly uniseriate, irregularly biseriate in places; discoidal area large, with the outer boundary sinuate, widest in front of middle, there five areolae deep.

Length, 4.40 mm.; width, 1.50 mm.

*Holotype* (female), Belo Horizonte, Minas Gerais, collected by OSCAR MONTE.

## 2. *Teleonemia leitei*, sp. nov.

Moderately elongate, yellowish brown, some nervelets black-fuscous. Head dark brown, with five, appressed, testaceous, moderately long spines. Antennae rather stout, densely and shortly pilose, dark brown, the terminal segment black; segments I and II short, the latter obconical; III slightly bowed, slightly enlarged towards tip, three and one-half times as long as IV. Rostral laminae foliaceous, testaceous: rostrum long, brown, dark at apex, extending almost to end of sulcus. Bucculae broad, testaceous, contiguous in front.

---

* A parte IV desta serie tendo sido publicado em inglez, esta parte V tambem o é na mesma lingua.

** Parte IV of this series, Arq. Inst. Biol., 9, 1938, pp. 51-57, 2 text figures and 2 pls., contains the references to all previous articles.

Pronotum moderately convex, coarsely pitted, distinctly tricarinate; carinae non-areolate, the lateral parallel; hood small, slightly produced forward in front at middle; paranota narrow, reflexed against the pronotum, very narrow behind, slightly wider and uniseriate in front. Elytra slightly constricted beyond middle, the areolae clouded with brown, with small fuscous spots; costal area very narrow, uniseriate, the areolae hyaline. Subcostal area wider, biseriate; discoidal area large, sometimes not very distinctly defined, widest a little before middle.

Length, 3.90 mm.; width, 1.30 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 6 *paratypes*, São Paulo, March 13, 1935, on *Pithecoctenium echinatum*, M. C. LEITE collector.

The antennae are slightly longer and the hood more sharply elevated in the male. The hood is distinctly depressed and flattened in the allotype. The color, shorter antennae, less convex paranota, longer rostrum and broader apical portion of elytra separate this insect from *T. luctuosa* STAL.

### 3. *Teleonemia telluris*, sp. nov.

Very elongate, slender, testaceous, the pronotum brown, the legs and antennae dark reddish brown, the distal segment of the latter black. Head reddish brown, with five, stout, moderately long, appressed, testaceous spines. Antennae very long, moderately stout, closely and shortly pilose; segment I and II very short, the former slightly longer; III very long, becoming darker apically, slightly bent, a little more than three times as long as IV, the latter moderately long. Rostral channel deep, not very wide, open behind, the rostrum reaching almost to end of sulcus. Bucculae testaceous, closed in front.

Pronotum strongly convex, tricarinate; median carina slightly more elevated, composed of one row of small areolae; lateral carinae not so widely separated and sub-parallel on triangular process, slightly divaricating from there forward, the areolae very tiny; hood small, inflated, testaceous, faintly produced forward in front at middle. Elytra faintly constricted beyond middle, the areolae of discoidal and sutural areas considerably embrowned; costal area very narrow, a little wider opposite apex of discoidal area; subcostal area broader, biseriate; discoidal area very long, narrow at base and apex, not bounded by a prominent nervure, widest in front of middle, there five areolae deep.

Length, 4.25 mm.; width, 1.20 mm.

*Holotype* (male) and *allotype* (female), Chapada, Mato Grosso.

The elongate form, narrow paranota, pronotal carinae and long slender appendages separate this insect from its congeners.

### 4. *Leptoypha braziliensis*, sp. nov.

Elongate, moderately reddish brown. Head black, the spines greatly reduced. Eyes black, moderately large. Legs short, stout, dark reddish brown. Antennae dark reddish brown, short, the first two segments very short (last two segments lost after specimen was received). Pronotum moderately convex, coarsely pitted, tricarinate, the posterior triangular process very long, areolate; lateral carinae almost obsolete on disc, sharply raised both in front and behind,

converging posteriorly; median carina very distinct but less elevated on disc; collar raised at the middle and there projecting acutely backwards so as form a small, low, flat, triangular shaped hood-like structure, the anterior margin slightly concave; paranota represented by a very narrow non-reticulate ridge; calli raised, blackish. Elytra strongly overlapping; the areas sharply marked off; costal area very narrow, uniseriate, the areolae very tiny; subcostal area rather broad, mostly triseriate, quadriseriate in widest part; discoidal area large, extending beyond middle of elytra, widest behind middle, six areolae deep in widest part.

Length, 3.55 mm.; width, 1.20 mm.

*Holotype* (female), Brazil (Amazon region).

This is the first record of this genus in South America. *L. morrisoni* DRAKE from the West Indies and Canal Zone is a larger and broader species and has much longer appendages and a much different pronotum. In certain structures of the pronotum, *braziliensis* slightly modifies the generic conception of *Leptoypha* STAL.

### 5. *Amblystira pensa*, sp. nov.

Moderately elongate. Head strongly convex above, the median and frontal spines very short, testaceous, the hind pair long, appressed to head, testaceous. Eyes large, black. Bucculae black, contiguous in front. Pronotum beneath and sides black. Rostral channel widening posteriorly, black, the laminae very narrow, black; rostrum testaceous, extending beyond middle of mesosternum. Abdomen reddish brown. Legs long, slender, testaceous, the tarsi dark. Antennae long, rather slender, testaceous, most of terminal segment black; segment I short, about two and one half times as long as II, the latter short; III long, straight, less than twice as long as IV, the latter long.

Pronotum strongly convex, coarsely pitted, tricarinate, black-fuscous, the collar and apex of triangular process testaceous; carinae distinct, rather thick, non-reticulate, the lateral ones converging posteriorly; calli black; collar raised, with one row of large areolae in front. Elytra rather narrow, broadest before apex, constricted before middle, testaceous, a large spot covering apical half of discoidal area and extending into subcostal area and a very broad, T-shaped band in sutural area dark fuscous; costal area rather narrow, uniseriate; subcostal area mostly uniseriate, biseriate in widest part; discoidal area impressed, bounded by a raised, uniseriate nervure, widest beyond middle, there five areolae deep.

Length, 3.30 mm.; width, .80 mm.

*Holotype* (male) and *allotype* (female), Belo Horizonte, Minas Gerais, collected by OSCAR MONTE.

The paranota are represented by a narrow, non-reticulate ridge, except opposite calli where the areolae are distinct and very small. The carinae, paranota and color marking on elytra are distinguishing characters.

## 6. *Tingis saueri*, sp. nov.

Moderately large, elongate, yellowish brown. Head reddish brown, moderately convex above, the spines short, pale testaceous. Eyes black. Antannae long, rather slender, yellowish brown, the terminal segment mostly black; segment I slightly stouter and twice as long as II; III very long, straight, almost three times as long as IV, the latter slightly fusiform, long, sparsely clothed with rather long, bristly hairs. Bucculae testaceous, contiguous in front. Rostral channel wide, much wider and chordate on metasternum, the laminae pale testaceous. Rostrum extending to middle of mesosternum, its apex blackish. Legs long, rather slender, yellowish brown, the tarsi brown.

Pronotum moderately convex, coarsely pitted, distinctly tricarinate, the carinae non-reticulate; lateral carinae parallel, the median slightly more elevated. Collar raised, reticulate, subtruncate in front. Paranota narrow, uniseriate, the outer margin finely serrate. Elytra overlapping behind, narrow, the lateral margin finely serrate; costal area biseriate, the areolae moderately large; subcostal area quadriseriate, the areolae smaller; discoidal area small, impressed, not reaching middle of elytra, widest a little beyond middle, there quadriseriate.

Length, 2.75 mm.; width, 95 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 6 *paratypes*, Recife, Pernambuco, Oct. 23, 1938; 2 *paratypes*, João Pessôa, Paraíba, Sept. 8, 1938. Allied to *T. oliveira* D. and H., but readily separated from it by the uniform color, less tumid head and shorter rostrum. The antennae and legs are also slightly stouter. Named in honor of Mr. H. F. G. Sauer who helped collect this and other specimens in the States of Paraíba, Ceará and Pará.

## 7. *Campylotingis clavata*, sp. nov.

Very small, testaceous, the head brown. Antennae long, slender; segment I brown, nearly three times as long as II, the latter short and testaceous; III long, slender, testaceous; IV very strongly swollen and black at apex, the basal portion slender and testaceous. Head strongly convex above, with five long, slender, testaceous spines. Eyes black. Body beneath black. Legs long, slender, testaceous, the tips of tarsi embrowned. Rostrum extending beyond middle of mesosternum, brown, black at apex; rostral laminae widely separated and chordate on metasternum.

Pronotum tricarinate, finely pitted, embrowned; carinae foliaceous, each uniseriate, the areolae small, the lateral ones parallel; paranota narrow, testaceous, mostly uniseriate, in front biseriate, the inner row of areolae very tiny; collar sharply and jointly raised at middle with median carina. Elytra narrow, testaceous; costal area rather narrow, uniseriate; subcostal area biseriate; discoidal area elongate.

Length, 2.20 mm.; width, 60 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 1 *paratype*, Belo Horizonte, Minas Gerais, collected by Oscar Monte. Separated from allied species by its small size and the strongly clavate fourth segment of the antenna.

## 8. *Leptodictya austrina*, sp. nov.

Very similar to *L. madra* Drake and Hambleton in color and general appearance, but readily distinguishable by its narrower elytra, more elevated carinae, darker antennae and parallel lateral carinae. Hood and anterior margin of paranota also less produced forward in front. Antennae moderately long, slender, brown to dark fuscous, the basal portion of the first segment and joints between segments testaceous; segment I not quite as long as II; III nearly three times as long as IV. Carinae foliaceous, uniseriate, all slightly more elevated in front, the median more so and distinctly biseriate there. Overlapping portion of paranota biseriate, the outer margin nearly straight. Costal area rather widely reticulated, five areolae deep in widest part.

Length, 3.35 mm.; width, 1.80 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 28 *paratypes*, Ribeirão Preto, São Paulo, Jan. 26, 1939, taken on *Olyra* sp.

In *L. luculenta* Drake, the antero-lateral angles of the pronotum extend much farther forward and the costal area is much more closely reticulated. In one paratype the third antennal segment is more or less testaceous. The head is armed with five very long spines, the median and hind pair are longer and the former extend beyond the apex of second antennal segment.

## 9. *Leptodictya nota*, sp. nov.

Rather small, conspicuously marked with large, fuscous-black spots. Head brown, strongly tumid above, with five, long, slender, testaceous spines. Bucculae long, areolate, brown, contiguous in front. Rostral channel narrow, open behind, the laminae testaceous. Rostrum long, brown, black at tip, reaching slightly beyond apex of sulcus. Body beneath brown. Legs slender, pale testaceous, the tips of tarsi dark.

Pronotum dark fuscous, the triangular process lighter; lateral carinae parallel, mostly testaceous, foliaceous, each composed of a single row of tiny areolae; median carina slightly more foliaceous, the areolae a little larger, more elevated and biseriate at base of hood. Paranota testaceous, reflexed portion uniseriate, also the lower portion uniseriate. Elytra strongly widening posteriorly, the tips separated; costal area very broad, five areolae deep in widest part, the areolae in the darkened areas largely black-fuscous, others largely hyaline; subcostal area narrow, brown, biseriate; discoidal area brown, narrow, not quite reaching middle of elytra; sutural area mostly dark, the areolae along apical portion with pale centers.

Length, 2.90 mm.; width, 1.40 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 66 *paratypes*, Belém, Pará, Oct. 3, taken on *Olyra* sp.

The color and shape of elytra and narrow paranota separate this species from allied forms. The hood is moderately large, sharply roof-shaped above, slightly produced forward, pale, the veinlets fuscous.

## 10. *Leptodictya madra*, sp. nov.

Moderately long, broad, brownish. Head brown, convex above, with five very long, slender spines, the median longest and reaching beyond the apex of second antennal segment. Antennae brownish, slender, moderately long, the last segment mostly fuscous; segment I slightly stouter and twice as long as II; III concolorous with I and II, twice as long as IV, the latter long, black. Bucculae closed in front. Rostral channel moderately wide, the sides subparallel, open behind, the rostrum reaching middle of metasternum. Body beneath brown. Legs brown, the tarsi dark.

Pronotum distinctly pitted, reticulate behind, moderately convex, tricarinate; carinae uniseriate, the areolae very tiny, the lateral carinae slightly divaricating posteriorly and slightly less foliaceous. Hood sharply raised, moderately large, slightly produced forward at middle in front. Paranota moderately wide, the outer margin nearly straight, the overlapping portion biseriate and with the outer edge resting on the sides of pronotum. Elytra very broad, the tips broad and separated, the areolae hyaline; costal area very broad, indistinctly serrate along outer margin, the areolae irregularly arranged and seven or eight deep in widest part; subcostal area very narrow, uniseriate; discoidal area elongate, reaching middle of elytra, widest near middle, there four areolae deep; sutural area widely reticulated, mostly triseriate.

Length, 2.85 mm.; width, 1.80 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 3 *paratypes*, Belém, Pará, Oct. 9, 1938, taken on *Olyra* sp.

The anterior margin of pronotum, carinae and costal area separate this insect from *L. luculenta* DRAKE and other closely allied forms.

## 11. *Leptodictya nema*, sp. nov.

Allied to *L. austrina* D. and H., but with shorter antennae and spines, and much more closely reticulated. Antennae rather short, testaceous, the terminal segment embrowned; segment I not quite twice as long as II; III twice as long as IV. Head black, convex above, with five, moderately long, sharp, testaceous spines. Legs slender, testaceous, the tarsi dark. Rostrum brown, extending to apex of sulcus. Rostral channel open behind,, slightly widening posteriorly, the laminae foliaceous and testaceous.

Pronotum dark brown, tricarinate, each uniseriate, the areolae small, the lateral carinae faintly converging posteriorly, the median slightly more elevated; hood pale testaceous, sharply raised, faintly produced anteriorly; paranota pale testaceous, rather narrow, the reflexed portion biseriate, the areolae rather small. Elytra brownish, broad, rather closely reticulated; costal area broad, seven areolae deep, the areolae not arranged in definite rows; subcostal area biseriate; discoidal area large, narrowed at base and apex, extending slightly beyond middle of elytra, widest slightly beyond middle, there six areolae deep.

Length, 3.65 mm.; width, 1.80 mm.

*Holotype* (female), Viçosa, Minas Gerais, May 12, 1934.

This species is large and much lighter in color than *L. olyrae* DRAKE. The hood is rather large, broad, testaceous and slightly produced forward at middle in front.

## 12. *Leptodictya dola*, sp. nov.

Moderately broad, testaceous, the pronotum brown. Head black, with five long, testaceous spines. Antennae rather long, testaceous, the basal three-fourths of first and distal three-fourths of fourth segment black; segment I stouter and two and one-half times as long as II; III two and one-half times the length of IV. Rostrum reaching to meso- metasternal suture, the laminae foliaceous, testaceous and not contiguous behind.

Paranota moderately convex, tricarinate; lateral carinae parallel, unseriate, the areolae small; median carina more strongly raised anteriorly, mostly unseriate, the areolae obsolete behind, biseriate in front; hood sharply raised, moderately large, testaceous, slightly produced forward at middle in front; paranota moderately wide, the overlapping portion mostly biseriate, narrowed in front. Elytra broad, testaceous, the nervures in distal half and along outer margin of basal half slightly embrowned; costal area broad, widely reticulated, six areolae deep in widest part, the areolae large; subcostal area narrow; discoidal area narrow; extending to middle of elytra, four areolae deep in widest part. Areolae hyaline. Legs slender, testaceous.

Length, 3.75 mm.; width, 1.80 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 5 *paratypes*, Viçosa, Minas Gerais, June 10, 1934, taken on *Panicum maximus*.

The shorter antennae, color of first antennal segment and shorter and broader elytra separate this species from *L. comitis* D. and H.

## 13. *Leptopharsa retrusa*, sp. nov.

Head black, the basal portion concealed by the hood; spines short, testaceous. Rostral channel widening posteriorly, not constricted, closed behind, the laminae testaceous; rostrum extending to apex of channel. Body beneath black. Legs slender, testaceous. Antennae slender, testaceous, the apical segment black; segment I slightly stouter and about two and a half times as long as II; III two and one half times as long as IV.

Pronotum convex, pitted, shining, black, tricarinate, the triangular process areolate, testaceous; median carina testaceous, foliaceous, uniseriate, the areolae moderately large; lateral carinae distinct, non-reticulate, slightly converging posteriorly, black, testaceous on triangular process; paranota narrow, testaceous, uniseriate, biseriate opposite base of collar, the areolae hyaline and moderately large; hood subglobose, moderately large, black-fuscous. Elytra moderately constricted beyond middle, strongly overlapping and jointly rounded behind, costal area moderately broad, testaceous, mostly biseriate, triseriate in widest part, the areolae moderately large, hyaline, arranged in fairly regular rows; subcostal area rather wide, triseriate, the nervelets to base of discoidal area black; discoidal area impressed, slightly raised a little beyond middle of boundary separating subcostal area, not reaching middle of elytra, widest beyond middle, there four areolae deep, the nervelets black; sutural area testaceous, more widely reticulated, the areolae hyaline.

Length, 2.70 mm.; width, 1.00 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 13 *paratypes*, Belém, Pará, Oct. 3, 1938.

The hood and carinae separate this species at once from closely related members of the genus.

14. *Leptopharsa scita*, sp. nov.

Very similar to *L. furcata* (STAL) in color, markings and general appearance, but readily separated from it by the much smaller, testaceous hood, shorter spines on head, shorter discoidal area and much shorter rostrum.

Pronotum black, testaceous behind; carinae foliaceous, uniseriate, the areolae moderately large, the lateral carinae divaricating anteriorly. Thorax beneath blackish, the abdomen brown. Rostrum reaching to the intermediate coxae. Other characters similar to *furcata* (STAL).

Length, 3.30 mm.; width, 1.40 mm.

*Holotype* (male) and 3 *paratypes*, Rio de Janeiro, Jardim Botanico, H. DE SOUZA LOPES, collector.

In *L. furcata* the hood is about twice as high, and the nervelets are embrowned. The rostrum extends beyond the apex of sulcus.

15. *Leptopharsa pacis*, sp. nov.

Head brown, strongly convex above, the median spine very long, slender, porrect, testaceous, the anterior and posterior pairs shorter, testaceous, strongly bent downwards. Rostrum long, reaching almost to end of sulcus. Rostral laminae testaceous, foliaceous, not meeting behind. Body beneath brown. Antennae long, slender, testaceous; the distal three-fourths of apical segment black; segment I slightly more than four times as long as II; III very long, very slender, two and one-half times as long as IV, the latter long and slender.

Pronotum brown, testaceous, tricarinate; carinae foliaceous, testaceous, uniseriate, the lateral carinae constricted at base of triangular process, the median carina more foliaceous and with larger areolae; hood moderately large, inflated, testaceous, slightly projecting forward in front; paranota moderately broad, testaceous, mostly triseriate, the areolae moderately large and hyaline. Elytra broad, widening posteriorly, with a broad, oblique band near apex, the outer margin finely serrate, the tips separated; costal area broad, five areolae deep in widest part, the areolae large and hyaline; subcostal area much narrower, triseriate, discoidal area moderately large, not reaching middle of elytra, narrowed at base and apex, widest a little beyond middle, there quadriseriate, a spot along outer margin before the apex (and extending into subcostal) fuscous.

Length, 4.15 mm.; width, 2.00 mm.

*Holotype* (female), *allotype* (male) and 2 *paratypes*, Baía collected by GREGORIO BONDAR.

Similar to *L. furcata* (STAL) but much broader, elytra more widening posteriorly, apical fascia of elytra more oblique and costal area with five areolae in widest part.

16. *Leptopharsa pensa*, sp. nov.

Similar to *L. lineata* (CHAMPION) in size, general appearance and markings, but separated from it by the much longer median and posterior spines of head,

more strongly foliaceous carinae, wider subcostal area and non-constricted elytra. Hood testaceous, sharply raised, rather long, moderately high, very narrow, produced forward in front. Lateral carinae terminating anteriorly a little behind base of hood, parallel, foliaceous, each with a single row of small areolae. Median carina more strongly foliaceous, uniseriate. Elytra much broader at apex than in *lineata,* the costal area wider, with larger areolae, biseriate, sometimes with a few extra areolae at widest part; subcostal area bi- or triseriate, the areolae much smaller. Body beneath black. Rostral channel narrow, not constricted, open behind, the laminae testaceous. Rostrum brown, black at tip, extends to end of channel.

Length, 3.10 mm.; width, 1.30 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 22 *paratypes,* São Paulo, June 20, 1935, taken on *Scleria myriocarpa.*

The inner row of areolae of costal area are much smaller, the elytra much narrower apically and the lateral carinae longer in *L. lineata* (CHAMPION).

### 17. *Leptopharsa modica,* sp. nov.

Similar to the foregoing species in shape and general appearance, but smaller, narrower, and with the nervures considerably infuscated. Pronotum black, tricarinate, the carinae and hood very similar to *psychotriae,* but with veinlets dark; paranota narrower, biseriate, the veinlets dark. Rostrum reaching meso-metasternal suture. Elytra much narrower than in *psychotriae,* most of the nervelets dark fuscous; costal area wide, five areolae deep in widest part, the areolae much larger in costal area opposite the discoidal area. Areolae hyaline. Other characters very similar to *psychotriae.*

Length, 3.00 mm.; width, 1.55 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 4 *paratypes,* Capital, São Paulo, July 21, 1935. The dark fuscous nervures of all reticulated areas, narrower paranota and more foliaceous carinae separate this species from *L. hyaloptera* (STAL).

### 18. *Leptopharsa psychotriae,* sp. nov.

Very similar to *L. fortis* D. and H., but separated from it by the shorter hood and the costal area with a very closely reticulated area (veinlets dark fuscous) within just opposite the distal portion of discoidal area; also shorter than *fortis.* Pronotum reddish to dark fuscous brown, tricarinate, all carinae uniseriate, the median more foliaceous, and the lateral slightly converging posteriorly; hood very sharply elevated, slightly projecting forward in front. Rostrum not quite reaching end of sulcus. Elytra very broad, the tips separated; costal area very broad, with large areolae (except in the numerous small, fuscous areolae near the base within); subcostal area rather broad, triseriate in widest part; discoidal area short, the outer margin sinuate and raised, widest behind middle, there four areoale deep. Legs and antennae slender, testaceous, the last segment of the latter black. Areolae hyaline. Other characters similar to *L. fortis.*

Length, 3.00 mm.; width, 1.75 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 40 *paratypes*, Viçosa, Minas Gerais, May 27, 1934, taken on *Psychotria* sp.

### 19. *Dicysta amica*, sp. nov.

Moderately large, broad, testaceous, the nervures of tumid structures considerably infuscate. Antennae slender, brown; segment I slightly stouter and twice as long as II; III twice as long as IV, the latter long. Rostral groove open behind, the rostrum reaching almost to end of sulcus. Body beneath brownish black. Legs slender, brown.

Hood large, strongly inflated behind, narrowed anteriorly, sloping obliquely downwards and extending in front of head. Median carina strongly inflated behind, the latter nearly as high as hood but shorter, the nervure connecting the crest of inflated portion sloping obliquely downwards and united with median nervure of posterior portion of hood a little below the middle, the portion of carina between the two inflated portions short and composed of one large cell. Paranota large, strongly reflexed, curved inwards in front and behind, triseriate in widest part. Elytra broad, widest near base, moderately narrowed posteriorly, the tumid elevations large, slightly concave within; costal area broad, mostly triseriate, quadriseriate in widest part. Areolae hyaline.

Length, 2.90 mm:; width, 1.80 mm.

*Holotype* (female), *allotype* (male) and 2 *paratypes*, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Resembles *D. vitrea* Champion and *D. hollandi* Drake but with smaller hood and narrower costal area. The median carina is longer between the hood and the inflated apical portion and the latter is also distinctly smaller. The paranota separates it at once from *D. braziliensis* Drake.

### 20. *Dicysta limata*, sp. nov.

Head, except eyes, concealed by the hood. Antennae slender, long, testaceous; segment I rather long, slightly stouter and three times as long as II; III slender, slightly curved, twice as long as IV, the latter long. Bucculae broad, brown, closed in front. Rostral channel widening posteriorly, the laminae brown. Rostrum extending to apex of channel. Spines on head atrophied. Legs slender, testaceous.

Pronotum pitted, brown, unicarinate, the triangular portion pale testaceous, areolate; paranota broad, strongly reflexed, moderately recurved behind, biseriate, sometimes triseriate in widest part, the areolae large and hyaline. Hood moderately large, somewhat compressed laterally, distinctly longer than high, testaceous, the median nervure enlarged and embrowned, the areolae moderately large. Median carina with the inflated portion nearly as large as hood but slightly more compressed, the median nervure of latter and dorsal nervelets also embrowned; portion between inflated apex and hood rather short, the dorsal nervure curved downward and united with median nervure of hood about the middle of its hind portion, composed of two or three large, hyaline cells. Elytra moderately broad, distinctly and broadly constricted beyond the middle, testaceous, with a broad, oblique, brownish band near the apex; tumid elevations

moderately large, narrow and pointed at crest; costal area rather wide, mostly biseriate, triseriate in widest part, the areolae moderately large and hyaline. Body beneath dark brown. Male claspers strongly curved.

Length, 2.60 mm.; width, 1.20 mm.

*Holotype* (male), *allotype* (female) and 18 *paratypes,* Belém, Pará, Oct. 3, 1938; 4 *paratypes,* São Luiz, Maranhão, Oct. 18, 1938, and 9 *paratypes,* Fortaleza, Ceará, Sept. 24, 1938. The hood, median carina, paranota and costal area separate this species from its nearest relatives.

## VINTE NOVAS ESPECIES DE TINGITIDAE DO BRASIL (HEMIPTERA) (PARTE V)

### *Resumo*

Neste trabalho são descritas vinte especies novas de *Tingitidae* dos Estados Unidos do Brasil, sete das quais são provenientes do Estado de Minas Gerais, quatro de São Paulo, tres do Pará, uma dos Estados de Ceará, Maranhão e Pará, uma de Pernambuco e Paraíba e uma de cada um dos seguintes Estados: Rio de Janeiro, Baía, Mato Grosso e da região Amazonica.

Vol. 10 — Art. 10 Dezembro de 1939

# BIOLOGIA DE "CALLIEPHIALTES DIMORPHUS CUSHM." (HYM. ICHN.) UM INTERESSANTE PARASITA PRIMARIO DA "PLATYEDRA GOSSYPIELLA (SAUNDERS)".

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 7 figuras no texto e estampa 27

INDICE



## HISTORICO E POSIÇÃO SISTEMATICA

Afim de se obterem os inimígos naturais da lagarta rosada *(Platyedra gossypiella* (SAUNDERS)) (1), que grassa como praga economica nos algodoais do Estado de São Paulo, em diversas épocas do ano são colocadas em gaiolas certas quantidades de maçãs ou capulhos de algodão atacados. Em 5 de Maio de 1937 a atenção do autor foi atraída para um exemplar macho de uma especie que ainda não fôra observada e de proporções incomuns, proveniente do material colhido no municipio de Campinas. Sómente em meiados de Junho do mesmo ano, quando se renovou o material, é que se obtiveram outros especimens, sendo daí por diante, enquanto perduraram nos campos os restos das culturas, progressivamente observado o seu aparecimento, repetindo-se esse fáto, em condições muito semelhantes, durante o ano de 1938 e parte de 1939. Apesar da frequencia com que era obtido, dadas as dificuldades iniciais para a sua criação, sómente em Agosto se conseguiu efetivamente determina-lo como um parasita primario e externo da lagarta rosada, quando no decurso do exame de capulhos se cons-

(1) Sauer, H. F. G. — 1938 — Inimigos Naturais da *Platyedra gossypiella* (Saund.) no Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biologico, 9: 187-199 e estampas.

tatou a sua existencia sobre a praga. Anteriormente á constatação definitiva, em varios cotonificios visitados, adultos dessa especie já haviam sido comumente observados nos residuos do beneficiamento.

Costa Lima, em seu trabalho (2), referindo-se a *Scambus (Epiurus)* sp., parasita obtido de sementes provenientes de Curvelo, Estado de Minas Gerais, com caracteristicas da especie que consideramos, fez-nos suspeitar de que se tratava do mesmo inimígo. Em carta de 6-5-1939, esse entomologista confirmou que «o plimplineo referido em 1919 é realmente *Calliephialtes dimorphus*».

Conforme o trabalho de Cushman (3), e de acôrdo com a chave que elaborou para a distribuição das sete especies tratadas, a especie que consideramos acha-se intimamente relacionada com *C. nigriceps* (Brullé), cuja femea facilmente se distingue devido ás asas faciadas; os machos, apesar do de *C. nigriceps* não ser conhecido, provavelmente pódem ser separados pelo caráter de coloração das patas.

Ao Snr. R. A. Cushman, do Bureau de Entomologia Norte Americano, o autor agradece a determinação da especie, bem como aos Snrs. Benedito L. Ribeiro, Rubens P. Machado e Sta. M. Lourdes N. Aquino pelos eficientes trabalhos prestados.

## DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA

Originalmente *Calliephialtes dimorphus* foi descríto de material colhido em Campinas, São Paulo. As investigações posteriores, porém, mostraram que a distribuição dessa especie dentro do Estado é muito extensa, podendo-se considera-la distribuída por todas as regiões. Em 1937 o autor teve a oportunidade de constata-la nos Estados de Minas Gerais (zona sul e, conforme Costa Lima, na zona do centro) e Rio de Janeiro (Lorena); e, em 1938, no Estado do Espirito Santo (Baixo Guandú). Nesse mesmo ano percorreu as regiões algodoeiras do Norte e Nordeste do Brasil, porém jamais teve ocasião de constata-la em qualquer dos outros Estados percorridos, cujas condições são geralmente diferentes das demais existentes no paiz.

## HOSPEDEIROS

Efetivamente na natureza, até presentemente, sómente foram encontradas duas especies sobre as quais esse parasita se hospeda: a lagarta rosada, *Platyedra gossypiella* (Saund.) e *Myelois decolor* Zeller.

---

(2) Costa Lima, A. da — 1919 — Contribuição para o conhecimento dos microhymenopteros parasitas da *Pectinophora gossypiella* no Brasil. Arquivos da Escola Sup. Agricultura e Med. Veterinaria, 3: 57-63.

(3) Cushman, R. A. — 1938 — A New Species of *Calliephialtes* from Brasil, with a Key of the Neotropical Species — Rev. de Entomologia, Rio de Janeiro, 9: 11-13.

Nas condições do insetario, diferentes especies de lagartas e larvas foram tentadas. As femeas durante o periodo de oviposição aceitavam-nas facilmente, realizavam a postura, porém, com uma só exceção, nunca se conseguiu a criação do parasita. As lagartas ou larvas em pouco tempo se tornavam completamente imprestaveis e improprias ao desenvolvimento do parasita.

*Leucinodes elegantalis* Guen. foi, nessas condições, a unica especie em cujas lagartas se conseguiu a obtenção do ciclo completo de *Calliephialtes dimorphus.*

## METODO DE CRIAÇÃO

Foi relativamente facil, após algumas tentativas preliminares, a criação da especie considerada, em condições artificiais. As observações foram inicialmente realizadas em laboratorio, e posteriormente nas condições do insetario, de onde se obtiveram geralmente todos os dados relativos á sua biologia.

Os adultos acasalados foram colocados em mangas de vidro (Estampa 27, fig. *A*) com as dimensões de 6,5 cms. de diametro na boca, 8,0 cms. na base, 13,0 cms. na porção mais larga e 19,0 cms. de altura. A abertura menor era coberta com um tecido leve, sendo a manga assentada sobre a areia colocada numa placa de vidro rasa, mantida constantemente húmida. Açucar e agua, em solução concentrada, foi fornecido como alimento. Suspensos no interior da manga, eram colocados tubos de bambú de 8 cms. de comprimento por 0,5 cms. de diametro, rachados ao meio, sendo uma das metades perfurada, numa faixa de 0,4 cm. de largura, com um alfinete numero 3, e mantidos inteiriços por meio de elasticos, de modo a fixar e manter bem ajustadas as duas metades. As lagartas rosadas eram postas em numero de cinco para cada tubo, e tres deles utilizados e retirados diariamente. Em pequenos pedaços de caule de algodoeiro murcho e préviamente descascados, cortou-se uma estreita tira do lenho e na porção mais grossa fizeram-se células, tres para cada um, nas quais se colocavam as lagartas rosadas sacrificadas e sobre cada uma um ovo, fechando-se a seguir com a lasca retirada e fixando-a por meio de elasticos enrolados nas extremidades. Dessa maneira conseguiu-se não só prevenir a falta de humidade, principalmente nos mêses sêcos, como tambem restringir os danos causados pelos ácaros, formigas e fungo, que nas nossas atuais condições prejudicam sensivelmente as criações. Todo o ciclo, até o aparecimento do adulto, obtem-se facilmente desse modo.

Para as observações detalhadas do crescimento larval os individuos foram criados isoladamente em pequenas camaras de baquelite

cobertas com laminulas de vidro; depois do desenvolvimento larval, transferiam-se as larvas adultas para pequenos tubos de vidro de 6 mms. de diametro, obturando-se as extremidades com tampões de algodão.

Anteriormente a esse processo, o qual proporcionou evidentes resultados, apesar de possivelmente não ser o mais pratico, foram tentados outros sistemas, como celulas individuais feitas de celuloide, utilização do papelão ondulado em tiras de 15 por 1 cm., no qual as lagartas rosadas se abrigavam, e tambem placas de gesso e de madeira para a criação individual. Seja pela facilidade da penetração de acaros e formigas, dificuldade de ser conservada a humidade, ou ainda propensão que o parasita tem para se alimentar de lagartas durante a sua vida adulta, esses processos não puderam ser empregados com o sucesso obtido com o metodo anterior, que visou tão sómente a criação do parasita para fins do estudo da sua biologia.

## DESCRIÇÃO DO ADULTO

E' a seguinte a tradução da descrição original de *C. dimorphus* (Fig. 7) por CUSHMAN, publicada em 1938 na Rev. de Entomologia:

F e m e a. — Comprimento 10 mms; antenas 6,5 mms; bainha do ovipositor 10 mms.

Cabeça polída, virtualmente sem escultura e muito esparsamente pilósa; tempora fortemente convexa, mas não ultrapassando a tangente dos olhos; face tão comprida quanto larga, fortemente convexa, com um sulco estreito ao longo da margem do olho, esparsamente pilósa; antena com 28-29 segmentos, com os segmentos subapicais quasi tão largos como compridos.

Torax robusto, polído, sem escultura, esparsamente piloso; notaules superficiais, mas distintos; propódeo em perfil moderadamente convexo, sem traços de carenas ou sulco mediano; estigma circular.

Patas fortes, femur posterior cerca de cinco vêses mais comprido do que largo; tarsos fortes e raramente tão compridos quanto as tibias, com os segundo articulos muito menores do que a metade do comprimento do articulo basal e pouco mais comprido do que o apical.

Asas com ciliação, além do estigma, muito densa e comprida; estigma largo, com a nervura radial ligeiramente além do meio; nervura radial recurvada; nervulo quasi perpendicular; postnervulo partido ligeiramente abaixo do meio; nervélo perpendicular partido quasi no meio.

Abdomen estreito, pouco mais do que pontuado, os tuberculos proeminentes sobre os 3-5 tergitos sem pontuações e polídos; primeiro tergito tão largo quanto comprido, muito mais curto do que o segundo; segundo tão comprido quanto largo; gastrocélo muito profundo; tuberculos bem definidos.

Ferruginea; cabeça, antena, propleura parcialmente, duas pequenas manchas no apice do propódeo, margens apicais dos tergitos 2-5 lateralmente, tergito apical e bainha do ovipositor, pretos; palpos brancos; patas anteriores e medianas palido-ferrugineas, basalmente amarelo-palidas; patas posteriores piceas, femur mais palido no lado interno e no meio; articulo apical do trocanter amarelo-palido, tibias amarelo-palidas na base e lado interno, excéto no apice, basitarsos

basalmente e esporas da tibia palidas; asas levemente enfumaçadas, com nervuras pretas, uma larga faixa além do estigma, hialina, com veias e pubescencia amarelo-claras; abdomen ferrugineo mais escuro que o torax.

Macho. — Comprimento: 5-9 mms.

Estruturalmente quasi igual á femea, excetuando-se o abdomen e tarsos que são muito mais delicados, e a ciliação das asas, menos densa e comprida. Difere na coloração da femea pelo seguinte: antenas palidas na base; patas, especialmente o par posterior, mais palidas; a coxa é picea somente no apice e a côr do trocanter e tibia mais palida ainda; abdomen enegrecido ou pardacento, com os tergitos 1-5 basalmente palidos, o primeiro avermelhado e os demais esbranquiçados.

## TAMANHO DOS ADULTOS

A variação de tamanho entre os sexos é bem apreciavel, não tanto com relação ao comprimento do corpo, mas principalmente pelo aspéto da femea, geralmente mais robusto. Entre os individuos do mesmo sexo não ha normalmente grandes diferenças, e só raramente se têm encontrado maiores variações. Num total de 328 adultos obtidos dirétamente do campo ou provenientes de capulhos colhidos nos algodoais, sómente 4 machos e 3 femeas diferiram de muito das medidas usuais. 207 machos mediam entre 5,0 e 10,0 mms., com a media de 8,8 mms. de comprimento. O corpo das 121 femeas medía entre 6,0 mms. e 11,0 mms., com a média de 9,0 mms. de comprimento; e a bainha do ovipositor, medindo entre 7,0 mms. e 11,5 mms., tinha média de 9,9 mms. de comprimento.

Entretanto, se para os adultos oriundos do campo se constatou maior uniformidade, para os obtidos durante as criações notavam-se comumente aberrações mais frequentes, devidas, não resta duvida, á condição e tamanho da lagarta hospedeira. Os limites extremos conservaram-se os mesmos, mas a média do comprimento do corpo foi levemente reduzida para ambos os sexos dos 273 adultos considerados.

## PROPORÇÃO DOS SEXOS

Nas condições naturais do Estado de São Paulo, durante todo o periodo em que se conseguiu obter adultos dos algodoais das duas ultimas culturas, a proporção de femeas foi sempre inferior á de machos.

Em 1937 essa diferença não foi tão pronunciada. Nesse ano colheram-se 157 machos e 130 femeas, ou 54,7 % e 45,3 %, respetivamente.

Dos 328 adultos reunidos de varias procedencias em 1938, 207, ou 63,2 %, eram machos e 121, ou 36,8 %, femeas. Em Campinas, desde Abril até Novembro, foram colhidos periodicamente e colocados em gaiolas capulhos de algodão. Desse material, proveniente sempre do mesmo local e cujos resultados parcelados se vêm na tabela 1, obti-

veram-se 242 adultos de *Calliephialtes dimorphus,* dos quais 148, ou 61,2 %, eram machos e 94, ou 38,8 %, femeas.

TABELA 1

Proporção dos sexos de *C. dimorphus* obtidos de capulhos provenientes do algodoal durante 1938 — Campinas

| Mêses | Adultos | | Porcentagem | |
|---|---|---|---|---|
| | Femeas | Machos | Femeas | Machos |
| Maio | 1 | 3 | 25,0 % | 75,0 % |
| Junho | 2 | 7 | 22,2 % | 77,8 % |
| Julho | 3 | 9 | 25,0 % | 75,0 % |
| Agosto | 10 | 22 | 31,2 % | 68,8 % |
| Setembro | 45 | 54 | 47,4 % | 52,6 % |
| Outubro | 23 | 31 | 41,0 % | 59,0 % |
| Novembro | 10 | 22 | 31,2 % | 68,8 % |
| | 94 | 148 | 38,8 % | 61,2 % |

Nas diversas criações realizadas esses resultados foram bem semelhantes, já nas criações feitas no terço final de 1937, já em todas as gerações obtidas no periodo de um ano, a partir de Junho de 1938.

## LONGEVIDADE EM CONDIÇÕES ANORMAIS

A duração da vida dos adultos de *Calliephialtes dimorphus* em condições anormais, mesmo quando submetidos ao mesmo ambiente e dotados de alimentação identica, tem limites bem variaveis. Isso se depreenderá de pronto pela observação das maximas e minimas inclusas na tabela 2, na qual a duração média não é bem representativa de um periodo mais ou menos uniforme de vida, exceção feita para alguns casos de vida mais curta, em vista da natureza do alimento fornecido. Nessa tabela enquadram-se os individuos observados nos mêses de inverno, nos quais a temperatura média equivaleu a 18,4° C. Em temperaturas mais elevadas ha um notavel decrécimo da duração da vida, e conquanto os dados aqui computados não sejam assaz numerosos para provar esse efeito, certas ocorrencias verificadas no decurso dos trabalhos esclareceram com nitidez o papel que as épocas mais quentes desempenham na redução da vida dos adultos.

6 machos providos com agua, açucar e lagartas viveram em Novembro (23,9° C) a média de 14,4 dias, mantendo-se vivos por um espaço bem maior os 34 incluidos na tabela; 4 outros, dotados de agua, mel e lagartas, viveram em Outubro (22,5° C) cerca de 10 dias em média

TABELA 2

Duração da vida dos adultos de *C. dimorphus* á temperatura média de 18,4 °C. supridos com diferentes tipos de alimento, Campinas - 1938

| Alimento usado | N. de indivíduos | Machos (duração em dias) | | | N. de indivíduos | Femeas (duração em dias) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Max. | Min. | Méd. | | Max. | Min. | Méd. |
| Sem alimento . . . | 42 | 11 | 3 | 6,0 | 23 | 13 | 3 | 7,1 |
| Agua . . . . . . . | 23 | 11 | 5 | 8,0 | 12 | 12 | 3 | 8,9 |
| Agua e açucar. . . | 39 | 48 | 10 | 20,9 | 17 | 57 | 14 | 39,8 |
| Agua e mel. . . . | 22 | 34 | 13 | 23,0 | 9 | 36 | 10 | 23,0 |
| Lagartas-agua-mél . | 10 | 34 | 16 | 19,9 | 12 | 116 | 12 | 32,6 |
| Lagartas-agua-açuc. | 34 | 85 | 10 | 22,0 | 39 | 86 | 13 | 48,4 |

menos que os 10 mencionados na mesma tabela. Igualmente para 8 femeas alimentadas com agua, mel e lagartas a duração média em Outubro (22,5° C), foi cerca de 14 dias menos do que para aquelas 12 que figuram na tabela 2.

Na tabela 3 tomou-se em consideração o numero total de individuos conservados para oviposição nas diversas gerações. Tais femeas, colocadas, sob qualquer aspéto, em identicas condições, viveram um periodo médio que declinava á medida que aumentava a temperatura.

Dessas femeas, cujo minimo nunca foi inferior a 10, apesar de, em certas ocasiões a mortandade atingir mais de 80 %, sempre sobreviveram algumas por um periodo mais amplo, vivendo uma vida regular, graças ao que se conseguiu não interromper em 1938 a criação, o que

TABELA 3

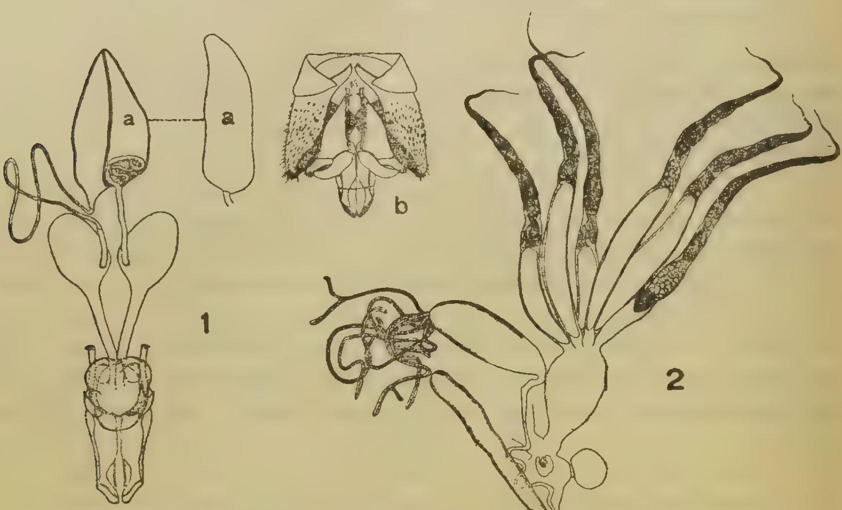
Duração da vida das femeas utilizadas para a oviposição durante Junho de 1938 a Maio de 1939 — Campinas

| Gerações | N. de individuos | | % de mortalidade | Duração média do total de individuos (dias) | Temperatura média °C | Duração média dos sobreviventes (dias) | Temperatura média °C. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | total | sobreviventes | | | | | |
| I . . . . | 15 | 10 | 33,3 | 46,8 | 17,9 | 60,3 | 18,1 |
| II . . . . | 16 | 8 | 50,0 | 37,5 | 20,8 | 58,2 | 21,1 |
| III . . . . | 11 | 4 | 63,6 | 31,0 | 22,0 | 46,7 | 22,9 |
| IV . . . . | 11 | 2 | 81,8 | 25,2 | 24,6 | 42,2 | 24,1 |
| V . . . | 10 | 4 | 60,0 | 31,7 | 24,6 | 43,2 | 24,6 |
| VI . . . . | 10 | 2 | 80,0 | 22,6 | 25,1 | 52,5 | 22,1 |
| VII . . . . | 11 | 7 | 36,3 | 44,1 | 21,6 | 55,0 | 21,5 |
| VIII. . . . | 10 | 7 | 30,0 | 53,5 | 18,0 | 59,2 | 18,3 |

não fôra possivel estabelecer em Dezembro de 1937. A longevidade desses individuos, mostra-se na tabela 3. Dela se depreende que, tanto no conjunto dos individuos, como nos que mantiveram um periodo regular, com poucas exceções a duração da vida decresceu á medida que a temperatura média aumentava.

## CÓPULA

A cópula póde ser observada em condições muito variadas e, em qualquer temperatura compreendida entre 17° C e 30° C, realizou-se satisfatoriamente. Tanto os machos como as femeas são sexualmente ativos mesmo imediatamente após a emergencia, mas essa atividade




*Calliephialtes dimorphus.* Fig. 1 - Orgãos de reprodução do macho (esquematico). *a* - testiculo, muito aumentado; *b* - genitalia, muito aumentada. Autor, del. Fig. 2 - Orgãos da femea (esquematico). Autor, del.

é mais intensa a partir de algumas horas depois da saída dos adultos dos respetivos casulos. Nas mangas de vidro onde se colocaram os casais, os machos comumente eram atraídos pelas femeas, tateavam-nas com as antenas e, sem mais preliminares, saltavam sobre elas. Não raro, porém, observou-se que os machos galgaram as femeas bruscamente, sem nenhuma outra manifestação. A's vêses a femea procura repelir o macho, mas ordinariamente essa resistencia é vencida.

Depois de firmar-se na femea com as patas, o macho curva o abdomen, fertilizando-a. Durante o áto a femea permanece comumente

quiéta, mas o macho movimenta ritimadamente as asas. Por fim, com as patas posteriores, a femea livra-se do macho.

A duração da cópula é muito variavel e se processa de 5 a 480 segundos, com uma média de 66 segundos para 132 observações. Quer os machos, quer as femeas, copúlam mais de uma vês; até 15 foram presenciadas. Aparentemente, cópulas superiores a 80 segundos foram suficientes para produzir a fertilidade das femeas, mas é provavel que normalmente se realize mais de uma.

A atividade dos machos restringe-se quando permanecem constantemente junto ás femeas, possivelmente por se habituarem ao odor, que assim não mais os estimulam á cópula.

## PREOVIPOSIÇÃO

O periodo de preoviposição, aqui considerado como o intervalo entre a cópula e o primeiro ovo, foi em média de 14,60 dias para 56 casos observados. Em geral esse periodo variou de 6 a 19 dias, tendo uma unica vês atingido o maximo de 39 dias.

Para 17 femeas utilizadas com o fim de ser verificada a partenogenese, esse periodo foi em média de 15,87 dias.

Em qualquer dos casos os individuos estavam submetidos ás mesmas condições. Aproximadamente 8 dias, em média, depois da emergencia, as femeas começam a procurar insistentemente as lagartas, matando-as e utilizando-as unicamente para a alimentação. Os limites extremos de 3 ou 19 dias foram presenciados em rarissimas ocasiões. Poucos dias após essa manifestação a femea entra em franco periodo de oviposição.

## OVIPOSIÇÃO

Entre 20 e 30° C a postura realiza-se satisfatoriamente, parecendo, porém, que aos 26° C ha certa intensificação. A postura efetua-se principalmente na claridade, porém quando as condições são extremamente propicias essa operação se efetua até na semi-obscuridade.

Para a oviposição, o parasita não manifesta nenhuma predileção por qualquer região do hospedeiro. Os ovos são depositados indiferentemente sobre o corpo ou sobre a cavidade onde se encontra a lagarta, sempre porém, junto a ela.

Normalmente o numero de ovos por individuo não ultrapassa de um, e assim supõe-se deva acontecer nas condições naturais. Em laboratorio, onde o numero de lagartas era limitado, e mesmo não o sendo, por ser um ambiente anormal, o numero por individuo chegou a atingir 8, mas nunca, em nenhum caso, mais de um chegou a ultrapassar o seu periodo larval.

Apesar de, em condições artificiais ser aceita pelo parasita a lagarta rosada em tamanhos menores, as que concluiram o desenvolvimento larval são indubitavelmente as que condizem melhor com os habitos da especie. E, devido á frequencia do *Calliephialtes dimorphus* atingir o ponto culminante em Agosto e Setembro, época em que as lagartas da *Platyedra gossypiella* estão, na grande totalidade, em fase hibernal, concebe-se facilmente a sua utilidade, bem como a sua preferencia pelos individuos já desenvolvidos. Não conseguindo, essa especie, perfurar superficies resistentes, é necessario que exista uma abertura para ela poder atingir o hospedeiro; e a maior abundancia coincide com a época em que as maçãs já se abriram e os capulhos têm fendas ou orificios para a penetração.

A oviposição (fig. 3) processa-se do modo seguinte:

Primeiramente a femea, caminhando sobre o capulho, ou como no caso da criação em laboratorio, sobre o tubo contendo as lagartas, movimentando as asas lentamente, por meio das antenas, localiza o hospedeiro. Procura insistentemente um orificio nas proximidades, tateando com as antenas, e ainda, com o seu auxilio, ajusta nele a extremidade do ovipositor, levantando bem alto o abdomen. As antenas voltam-se para frente e se extendem ou se apoiam á superficie onde as patas, afastadas, se firmam seguramente. Com movimentos do abdomen forçam a penetração do ovipositor, o qual comumente se encosta á face ventral do abdomen e entre as duas coxas posteriores, o que notadamente lhe proporciona maior firmeza. A bainha fica paralela ao ovipositor em sentido oposto. Com a extremidade do abdomen o ovipositor é compelido e, com movimentos rapidos, movido em qualquer direção em busca da lagarta. A's vêses o ovipositor penetra totalmente no orificio, e o abdomen se curva completamente, ocupando a bainha uma posição vertical e encostando na parte dorsal da extremidade posterior do abdomen. Uma celula feita em um tubo de vidro, coberta com celuloide, facilitou a observação do que se processava no seu interior. O ovipositor movimentado em todas as direções procurava atingir a lagarta que, ao ser tocada, de qualquer modo procurava defender-se, já procurando ocultar-se, já tentando prender o ovipositor com as mandibulas. Sua defesa, porém, é sempre insuficiente em lugares acanhados e a lagarta é atingida. Rapidamente, depois de algumas contorções, ela se paraliza. Mas depois da primeira ferroada o parasita insiste, e diversas outras são feitas. A seguir cessam os movimentos, ha contrações abdominais e em pouco presencia-se á saida do ovo. O ovipositor é retirado, volta á posição normal, e o parasita executa sua toaléte, voltando novamente á ação. Nem sempre a postura se faz na primeira tentativa. Muitas vêses primeiramente mata o

hospedeiro, ataca outro ou outros e por fim realiza a postura, voltando novamente aos que já foram previamente paralizados.

O periodo de oviposição para 80 femeas computadas, variou de 14 a 101 dias com a média geral de 31,6 dias. O numero de ovos por individuo variou tambem de 14 a 369, com a média de 100,7. A femea que forneceu o limite maximo, dissecada depois de morta, possuia mais ovos em seus ovarios, havendo, por conseguinte, indicações de maior numero de ovos. Duas femeas forneceram as maiores maximas: a pri-

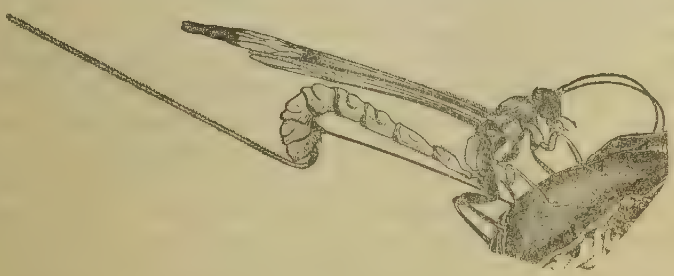


Fig. 3 - Femea de *C. dimorphus* por ocasião da postura. (A. R. Mazza, del.)

meira, alimentada com agua, açucar e lagartas, deu 342 ovos e a segunda, sob identicas condições, porém suprida com agua, mel e lagarta poz 369 ovos durante os 116 dias de vida.

A média de postura diaria para cada femea foi de 3,18 ovos, mas variou de 0 a 17 ovos.

Em casos isolados foi comum encontrarem-se até 19 ovos diarios por femea. Normalmente todos os ovos vingaram.

## PARTENOGENESE

Com o fim de determinar a reprodução por partenogenese, tomaram-se, inicialmente, 19 femeas virgens, obtidas dos capulhos colhidos no campo, em fins de Junho, colocando-as conjuntamente numa manga de vidro, supridas com agua e açucar e tambem lagartas, tal como se procedeu comumente e foi descrito no capitulo relativo ao metodo usado na criação, pg. 167.

Posteriormente, em Agosto e Dezembro, tomaram-se 12 femeas virgens criadas no insetario, dotando-as isoladamente das mesmas condições a que se submeteram as demais. Do total de 31 femeas, 17 mostraram-se ativas, mantendo os habitos normais. A progenie, porém, conseguida em todos os casos, foi constituida unicamente de machos, tal como se poderá ver na tabela 4 (Femeas não fecundadas).

TABELA 4

Periodo de desenvolvimento de ovo até adulto, de individuos criados no insetario, de Maio de 1938 até Maio de 1939, cujo ciclo abrangeu dois mêses consecutivos - Campinas

| Mês | Duração média do periodo de desenvolvimento de individuos provenientes de | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | femeas fecundadas | | | | | | | | | | femeas não fecundadas | | | | |
| | machos | | | | Temp. média oC. | femeas | | | | Temp. média oC. | machos | | | | Temp. média oC. |
| | N.o indiv. | Duração em dias | | | | N.o indiv. | Duração em dias | | | | N.o indiv. | Duração em dias | | | |
| | | Max. | Min. | Média | | | Max. | Min. | Média | | | Max. | Min. | Média | |
| Maio - Junho . . . | 43 | 30 | 26 | 28,4 | 18,0 | 6 | 29 | 27 | 28,3 | 18,0 | — | — | — | — | — |
| Junho - Julho. . . | 49 | 36 | 27 | 29,8 | 17,8 | 13 | 33 | 28 | 30,0 | 17,9 | — | — | — | — | — |
| Julho - Agosto . . | 79 | 33 | 25 | 28,3 | 18,1 | 29 | 34 | 27 | 29,7 | 18,2 | 89 | 32 | 25 | 27,3 | 17,9 |
| Agosto - Setembro . | 18 | 32 | 23 | 25,8 | 20,3 | 25 | 30 | 24 | 26,9 | 19,6 | 16 | 28 | 22 | 24,1 | 20,2 |
| Setembro - Outubro . | 21 | 27 | 19 | 21,7 | 21,5 | 13 | 24 | 20 | 22,0 | 21,6 | 34 | 26 | 19 | 22,3 | 21,5 |
| Outubro - Novembro . | 36 | 28 | 18 | 20,1 | 23,6 | 17 | 27 | 17 | 21,1 | 23,6 | — | — | — | — | — |
| Novembro - Dezembro | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 6 | 21 | 19 | 19,6 | 23,8 |
| Dezembro - Janeiro . | 24 | 20 | 15 | 18,2 | 23,5 | 21 | 24 | 17 | 19,1 | 23,7 | — | — | — | — | — |
| Janeiro - Fevereiro . | 34 | 20 | 16 | 17,4 | 23,9 | 20 | 22 | 18 | 18,9 | 24,1 | — | — | — | — | — |
| Fevereiro - Março . | 2 | 17 | 16 | 16,5 | 24,5 | 2 | 18 | 17 | 17,5 | 24,4 | — | — | — | — | — |
| Março - Abril. . . | 13 | 20 | 17 | 17,5 | 22,9 | 12 | 25 | 19 | 21,1 | 22,8 | — | — | — | — | — |
| Abril - Maio . . . | 31 | 25 | 22 | 23,2 | 20,4 | 27 | 27 | 22 | 24,1 | 20,4 | — | — | — | — | — |

## OVO

O comprimento do ovo (Est. 1, fig. 2) varia de 1,860 mms. a 2,120 mms., variando a largura, na região mais larga, de 0,260 mms. a 0,290 mms. A média para 95 ovos, medidos no decurso dos trabalhos, foi de 1,984 mms. de comprimento por 0,284 mms. na maior largura.

O ovo recemposto é de coloração branca opaca; é alongado, em geral arqueado ou ligeiramente arqueado, afilando gradativamente para a região caudal e mais abruptamente para a cefálica; corion com muitas pontuações salientes, dispostas em linhas mais ou menos uniformes e semelhantes a estrias, resistente e pouco flexivel.

Nessa especie, a incubação do ovo processa-se com rapidez. O prazo médio necessario para os 452 ovos observados e distribuidos por todas as épocas do ano foi de dois dias aproximadamente.

Apesar da temperatura exercer influencia na duração desse estadio, tal influencia não se verifica de maneira muito pronunciada, salvo quanto ás temperaturas inferiores a 18° C. Acima de 18,8° C até 25° C a incubação realizou-se praticamente em condições semelhantes, como se depreende da tabela 5.

A avaliação da influencia da temperatura foi feita calculando-se a média da temperatura ambiente correspondente á incubação de cada ovo, grupando-se os que se desenvolveram sob as mesmas condições.

Poucas horas depois da postura, ambas as extremidades do ovo vão-se tornando cada vês mais transparentes, (Est. 27, fig. B-a) murchando lenta e completamente em seguida (Est. 27, fig. B-b).

TABELA 5

Periodo de incubação dos ovos de *C. dimorphus*, Campinas 1938-1939

| N. de ovos total | Duração em dias | | | Temp. ºC. |
|---|---|---|---|---|
| | Média | Maxima | Minima | |
| 96 | 3,6 | 5 | 2,0 | 15,9 |
| 74 | 2,5 | 4 | 2,0 | 17,1 |
| 154 | 1,9 | 3 | 1,5 | 18,8 |
| 37 | 2,0 | 3 | 1,5 | 21,3 |
| 34 | 1,9 | 3 | 1,5 | 23,0 |
| 32 | 1,9 | 3 | 1,0 | 24,3 |
| 23 | 1,8 | 2 | 1,0 | 25,0 |
| 2 | 1,5 | 2 | 1,0 | 26,5 |
| 452 | 2,3 | — | — | — |

O ovo sofre modificação na forma, tornando-se alongado, com as duas extremidades arredondadas, muito ligeiramente curvado e afilando para a porção caudal, havendo uma leve dilatação na região mediana. Por transparencia, vê-se o embrião, de coloração levemente amarelada, e antes da eclosão, póde ser visto o movimento da larva. Para eclodir a jovem larva movimenta a cabeça contra a porção ventral da região cefálica do ovo e, distendendo o aparelho bucal, procura, com as mandibulas, romper o corion, o que consegue depois de algumas tentativas. E prosseguindo, faz uma abertura suficiente para, auxiliada pelos movimentos do corpo, emergir, em média depois de 40 minutos, deixando o corion que normalmente fica aderente á superficie do corpo da lagarta hospedeira.

## HABITOS E CRESCIMENTO LARVAIS

Pouco tempo depois do nascimento, si a eclosão se processou fóra do corpo do hospedeiro, em qualquer sitio da celula, após continuados movimentos a larva chega-se á lagarta rosada, e, até que consiga galga-la, alimenta-se na sua parte ventral ou lateral; si a larva já nasce sobre a lagarta hospedeira, inicia pouco depois a sucção, indiferentemente em qualquer porção do corpo, preferencialmente nos lados e dorso. A's vêses muda de lugar, deslizando sobre a lagarta; porém

é comum mudar simplesmente o aparelho bucal e processar á sucção num outro ponto. Normalmente todo o hospedeiro é absorvido, ficando unicamente o tegumento na cavidade, ou celula.

E' especie solitaria, nunca sendo possivel criar mais de uma sobre o individuo na mesma celula, nem mesmo quando mais de uma lagarta fosse usada e as larvas estivessem colocadas em pontos diametralmente opostos. Sem alimento a larva recem-nascida vive pouco.

Durante os trabalhos, dada, em certas ocasiões, a exiguidade do hospedeiro em condições favoraveis, utilizaram-se não raramente as lagartas de pequeno tamanho, o que determinou que muitas transferencias fossem feitas. Essa operação, realizada com auxilio de pincel de pêlo fino nos primeiros estadios larvais e com pinça nos ultimos, geralmente foi muito bem sucedida.

Só muito raramente as larvas do parasita deixaram de tecer o casulo. Quando isso aconteceu, porém, os adultos emergiram, na quasi totalidade, defeituosos.

O periodo de alimentação, conforme se vê na tabela 6 sob o titulo C r e s c i m e n t o  l a r v a l, variou de 3 a 14 dias, com a média

TABELA 6

Duração do periodo larval, Campinas — 1938 - 1939

| Crescimento larval (dias) | | | | Temp. °C. | Construção do casulo (dias) | | | | Temp. °C. | Duração do periodo larval (dias) | | | | Temp. °C. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N. indiv. | Max. | Min. | Méd. | | N. indiv. | Max. | Min. | Méd. | | N. indiv. | Max. | Min. | Méd. | |
| 21 | 13 | 8 | 8,6 | 15,8 | 27 | 5 | 2 | 2,6 | 15,7 | — | — | — | — | — |
| 101 | 14 | 7 | 8,1 | 17,1 | 27 | 4 | 2 | 2,6 | 17,3 | 171 | 29 | 10 | 13,8 | 17,2 |
| 131 | 10 | 4 | 6,3 | 18,8 | 23 | 3 | 2 | 2,4 | 18,6 | 42 | 13 | 8 | 11,3 | 18,6 |
| 22 | 8 | 4 | 5,8 | 20,4 | — | — | — | — | — | 29 | 12 | 8 | 9,8 | 19,2 |
| 54 | 9 | 5 | 5,2 | 21,3 | 48 | 3 | 2 | 2,2 | 20,5 | 31 | 12 | 8 | 9,4 | 20,3 |
| 92 | 8 | 4 | 5,1 | 22,8 | 62 | 3 | 1,5 | 1,8 | 22,6 | 36 | 12 | 7 | 9,0 | 21,2 |
| 14 | 7 | 4 | 5,1 | 23,3 | 32 | 2 | 2 | 2,0 | 24,2 | 52 | 11 | 5 | 8,1 | 22,5 |
| 70 | 6 | 3 | 4,3 | 24,5 | 12 | 1,5 | 1 | 1,5 | 25,1 | 127 | 14 | 6 | 7,9 | 23,7 |
| 2 | 5 | 4 | 4,5 | 25,1 | — | — | — | — | — | 6 | 8 | 6 | 6,8 | 24,2 |
| 6 | 4 | 3 | 3,1 | 26,2 | — | — | — | — | — | 13 | 10 | 6 | 7,0 | 25,2 |
| — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 | 7 | 7 | 7,0 | 26,1 |

geral de 6,1 dias. A fase larval completa, considerada desde a eclosão do ovo até o aparecimento das manchas dos olhos na prepupa, teve a duração variavel entre 6 a 29 dias, com a média geral equivalente a 12,4 dias, para os 508 individuos considerados.

Aproximadamente um terço do prazo médio necessario para completar-se a fase larval é dispendido na construção do casulo e periodos de repouso antes de tecer e depois, durante a transição para o periodo prepupal. Esse tempo é em média de 4,2 dias, sendo, porém, reduzido ou ampliado, conforme as variações de temperatura, que exercem nesse periodo notavel influencia, conforme se verá pelo exame da tabela mencionada.

O periodo de crescimento larval propriamente processa-se em tempo relativamente rapido e faz-se mediante cinco estadios (tabela 7). Pela observação de 30 individuos criados especialmente para esse fim,

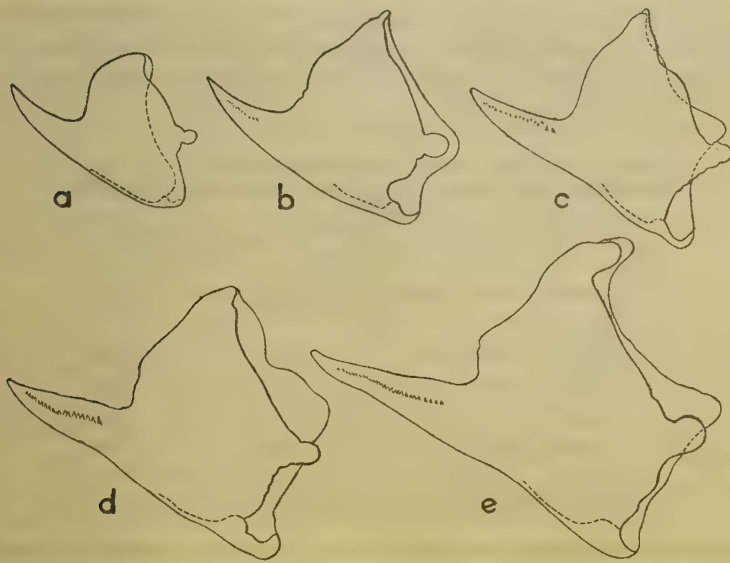



Fig. 4 - Mandibulas da larva de *C. dimorphus; a - e* - representando os 5 estadios larvais. Aproximadamente x 400. Autor, del.

foi possivel, si bem que trabalhosa, a determinação do prazo necessario para cada estadio. Conquanto 23,1° C tenha sido a média geral em que se praticaram as observações, o fato é que não sendo ela constante, as flutuações provocaram certas diferenças. Além disso, havendo casos em que as larvas, fóra do hospedeiro, precisam certo tempo para o encontrar, isso e ainda a propria condição das lagartas, que apesar de escolhidas não éra uniforme, e, finalmente, a necessidade que houve de perturbar umas larvas mais do que outras durante as observações, con-

tribuiu para que a disparidade na duração de cada estadio fosse mais pronunciada.

Essa desigualdade foi muito mais evidente nos dois primeiros estadios do que nos demais.

As larvas recem-nascidas são ativas, de coloração branca amarelada, semitransparente, passando a pardo-amarelada ou levemente rosada depois de ingerido o alimento. A cabeça é bem desenvolvida, distinta, semelhante a dedal, com antenas proeminentes, aparelho bucal distinto e mandibulas fortes, (fig. 4-a). O corpo, constituido de 13 segmentos bem definidos, afilando-se para a região caudal, é dotado de cerdas brancas, pequenas e delicadas. Nos estadios seguintes a cabeça tem a forma quasi globular, não é muito evidente e fica em parte recoberta pelo torax; o corpo mostra-se arqueado dorso-ventralmente, com coloração rosado-pardacenta, revestido de muitos pêlos pequeninos e cer-

TABELA 7

Duração dos estadios larvais á temperatura média de 23,1 °C e dimensões medias da larva de *C. dimorphus*, Novembro, 1938, Campinas

| Estadios larvais | Duração em dias | | | N. de individuos | Dimensões médias em mms. do | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Maxima | Minima | Média | | Compto. do corpo | Largura do III toraxico | Largura da capsula da cabeça |
| I | 1,017 | 0,333 | 0,583 | 30 | 1,400 | 0,310 | 0,256 |
| II | 1,708 | 0,208 | 0,875 | 26 | 1,920 | 0,540 | 0,328 |
| III | 1,208 | 0,250 | 0,833 | 16 | 2,405 | 0,760 | 0,416 |
| IV | 1,166 | 0,833 | 1,000 | 5 | 4,344 | 1,195 | 0,557 |
| V | 2,901 | 1,376 | 1,400 | 16 | 7,500 | 1,800 | 0,760 |

das maiores, mas dificeis de serem vistas. No quarto estadio verifica-se o aparecimento nitido das dobras dorsais, as quais determinam o aparecimento de picos dorsais dos 1.º ao 7.º segmentos abdominais, quando pronunciam o arqueamento do corpo. As dobras laterais são tambem muito evidentes e a larva crescida (Fig. 5-a) mostra a coloração rosada sob a coloração branca ou creme do tecido adiposo, muito abundante. O aparelho bucal, distinto em cada estadio, é notadamente evidente no ultimo (Fig. 5-b).

## CASULO

Depois de completar o seu desenvolvimento, a larva permanece em repouso por certo prazo, antes de iniciar a construção do casulo. Essa fase, que depende da propria condição do estado da larva, está

tambem em correlação com a temperatura e varía de algumas horas a 5 dias; mas normalmente a sua duração não ultrapassa de um dia.

Enquanto tece, a larva movimenta-se em todas as direções, unindo o fio á parede da cavidade onde se encontra, prosseguindo, com intervalos, a construção, até concluir o casulo.

A duração dessa operação é influenciada pela temperatura, tendo como limites o prazo minimo de 1 dia e maximo de 5 dias; mas a média geral para 231 individuos foi de 2,1 dias, o que póde ser verificado conforme os dados mencionados na tabela 6. Nas condições naturais o casulo sempre foi encontrado dentro das sementes do algodão, ocupando geralmente o espaço correspondente ás suas dimensões. Os casulos construidos em condições artificiais em tubos de vidro de 6 mms. de diametro tinham em média 9,35 mms. de comprimento por 4,8 mms. de largura, variando as dimensões entre 12 a 7 mms. de comprimento por 6 a 3 mms. de largura. São de côr pardo-amarelada, muito resistentes e de forma alongada, com as extremidades arredondadas.

Concluído o casulo, a larva permanece em repouso, por um periodo variavel de 0,5 a 14 dias, com a média de 1,8 dias, periodo esse estimulado dirétamente pela temperatura.

## PERIODO PREPUPAL

Entre os periodos larval e ninfal, depois de tecido o casulo e antes da transformação em ninfa, ha uma fase relativamente curta e intermediaria que, não sendo um verdadeiro estadio, é, no entanto, bem carateristica, representando o periodo prepupal.

Para as 485 prepupas consideradas desde Junho de 1938 até Maio de 1939, esse periodo variou de 1 a 6 dias, sendo a média geral 2,6 dias. As temperaturas foram consideradas individualmente, agrupando-se os individuos desenvolvidos em identicas condições. Tal como se póde observar na tabela 8, a temperatura manifesta a sua influencia, notadamente as mais baixas, que concorrem sensivelmente para a dilatação desse praso. Em vista da dificuldade que se encontra para determinar exatamente o inicio do periodo prepupal, tomou-se arbitrariamente uma referencia, qual seja o aparecimento das manchas dos olhos.

Quando vae entrar nessa fase, a larva sofre uma descoloração, passando a branco, porém ligeiramente obscurecida pela massa fecal. Perde quasi completamente os movimentos. Ha um estreitamento entre o torax e abdomen, tornando-se inicialmente achatada e ampla dos 1.º ao 5.º segmentos abdominais, afilando gradativamente para a região posterior. Em posição de repouso as dobras laterais dos 1.º ao 8.º segmentos abdominais são muito pronunciadas e, si faz movimentos,

sobresáem as dobras dorsais dos 1.º ao 7.º segmentos. As partes bucais tornam-se bem visiveis e póde-se notar o aparecimento dos olhos, representados primeiramente pelas pequenas manchas avermelhadas no primeiro segmento toracico. Torna-se arqueada e a região caudal re-

TABELA 8

Duração da fase prepupal de *C. dimorphus*, Campinas, Junho de 1938 a Maio de 1939

| N. de individuos | Duração em dias | | | Temp. °C. |
|---|---|---|---|---|
| | Média | Maxima | Minima | |
| 8 | 4,6 | 6 | 4 | 15,6 |
| 77 | 3,3 | 5 | 2 | 16,4 |
| 35 | 3,1 | 5 | 1 | 17,3 |
| 12 | 2,9 | 4 | 2 | 18,5 |
| 82 | 2,5 | 4 | 1 | 19,4 |
| 44 | 2,3 | 4 | 1 | 20,4 |
| 54 | 2,5 | 4 | 2 | 21,3 |
| 36 | 2,0 | 3 | 1 | 22,4 |
| 30 | 2,2 | 3 | 1 | 23,2 |
| 57 | 2,4 | 3 | 1 | 24,1 |
| 36 | 2,0 | 6 | 1 | 25,2 |
| 14 | 2,2 | 3 | 2 | 26,1 |
| 485 | 2,6 | — | — | 20,8 |

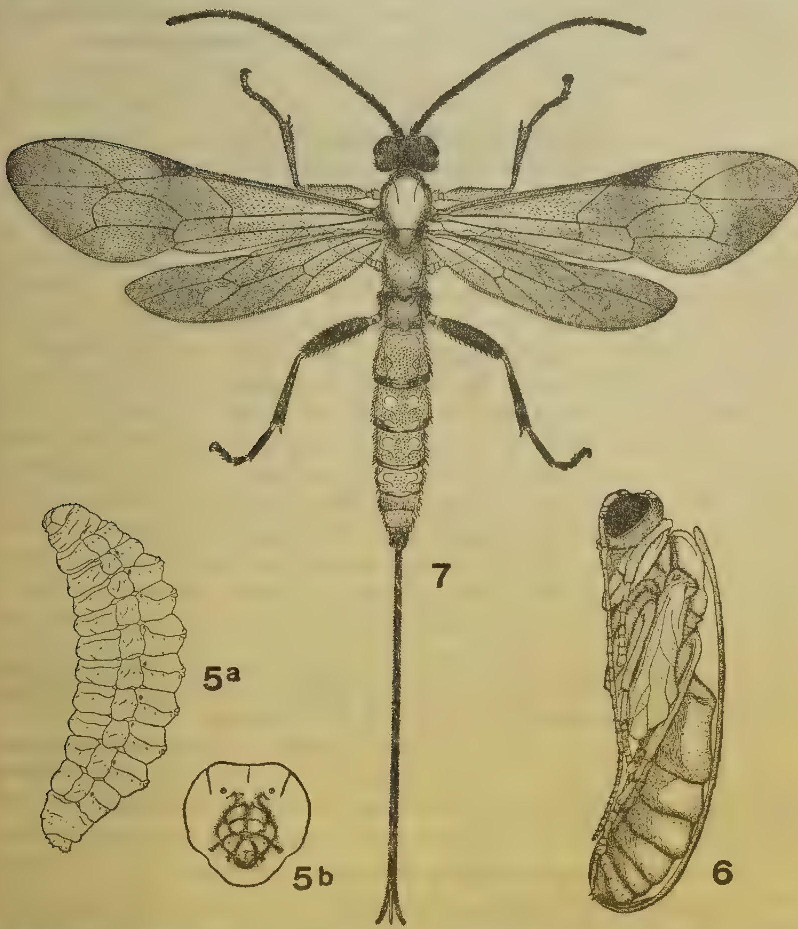
curva-se um pouco para cima. A cabeça e torax se distendem, notando-se claramente o estreitamento entre os 3.º toracico e 1.º segmentos abdominal; na porção toracica o tegumento apresenta-se liso, enquanto o restante do corpo se apresenta muito finamente enrugado.

Em seguida á expulsão do excremento, de côr preta, o qual adere ao casulo, apresenta nitidamente os caracteres tipicos: toma a coloração branca; evidenciam-se as manchas dos olhos; o corpo praticamente enrigece e se afila da região cefálica á caudal; os segmentos se definem bem, a contração pronuncia-se, assim como o arqueamento do corpo; o torax se expande mais lateralmente, as dobras pleurais e dorsais apresentam-se evidentes dos 1.º ao 8.º segmentos abdominais; o tegumento, liso na porção toracica, mostra-se rugoso na abdominal, sendo tal rugosidade menos pronunciada na face ventral; na região caudal os dois ultimos segmentos curvam-se para o dorso, indicando de certo modo o futuro sexo, si bem que nem sempre seja essa uma indicação segura: na femea geralmente a curvatura é mais pronunciada do que no macho.

Quando incomodada, procura defender-se realizando movimentos, volteando o abdomen rapida e continuamente.

## PERIODO NINFAL

Findo o periodo prepupal o tegumento rompe-se na região cefálica e lentamente deslisa para a região caudal, aparecendo a ninfa (Fig. 6), que determina esse novo estadio.




*Calliephialtes dimorphus* Cushm. Fig. 5*a* - Larva completamente desenvolvida, x 8 (A. R. Mazza, del.) Fig. 5*b* - Cabeça da larva no 5.º estadio, vista de frente. Autor, del. Fig. 6 - Ninfa da femea, vista lateral, x 8. Autor, del. Fig. 7 - Adulto femea, x 6. (A. R. Mazza, del.)

A duração desse periodo durante o ano inteiro esteve compreendida entre 15 e 4 dias, sendo a média geral de 9,5 dias para os 437 individuos considerados. Conforme se poderá depreender da tabela 9, houve estreita relação entre a temperatura e a duração desse estadio.

Logo depois de formada, a ninfa é de coloração branca, com os olhos e ocelos pardo-avermelhados. Estes, com a idade, ficam pretos. As mandibulas tornam-se castanhas e a cabeça adquire a côr preta. O torax, bem como os dois pares de patas anteriores, fica alaranjado e a coxa do par de patas metatoracicas escurece. Daí em diante, conforme se aproxima o término desse estadio, a ninfa vai gradualmente adquirindo a coloração carateristica do adulto.

TABELA 9

Duração da fase ninfal de *C. dimorphus*
Campinas, Junho de 1938 a Maio 1939

| N. de individuos | Duração em dias | | | Temp. °C. |
|---|---|---|---|---|
| | Média | Maxima | Minima | |
| 33 | 13,1 | 15 | 11 | 16,5 |
| 35 | 13,1 | 15 | 11 | 17,3 |
| 59 | 10,8 | 13 | 9 | 18,5 |
| 50 | 10,4 | 13 | 9 | 19,2 |
| 35 | 10,5 | 12 | 7 | 20,5 |
| 65 | 9,1 | 12 | 7 | 21,4 |
| 71 | 7,7 | 9 | 6 | 22,2 |
| 20 | 7,8 | 9 | 5 | 23,3 |
| 48 | 6,3 | 9 | 5 | 24,4 |
| 21 | 6,3 | 8 | 4 | 25,2 |
| 437 | 9,5 | — | — | 20,8 |

As dimensões das femeas estão compreendidas entre 6,5 mms. e 9,0 mms. de comprimento por 1,8 mms. e 2,2 mms. de largura, sendo a média de 8,0 mms. de comprimento por 1,9 mms. de largura para 23 individuos.

As ninfas dos machos medem entre 5,0 mms. e 9,0 mms. de comprimento por 1,5 mms. e 2,2 mms. de largura, tendo sido, para 18 individuos, a media de 7,8 mms. de comprimento por 1,8 mms. de largura. Quando perturbadas, as ninfas movimentam-se com rapidez.

## APARECIMENTO E VIDA DO ADULTO

Quando o *C. dimorphus* completa o seu periodo de desenvolvimento, liberta-se do involucro ninfal, o qual se reduz a pedaços, e faz no casulo, na extremidade anterior e um pouco lateralmente, um orificio circular, por onde emerge. Existindo sómente o casulo, a emergencia

dá-se geralmente num dia, havendo, porém, casos de duração menor, e outros em que esse prazo atinge a pouco mais de dois dias.

Observou-se em laboratorio, quando os adultos emergiram dentro das proprias celulas feitas em pedaços de caules de algodoeiros, onde foram criados, que eram capáses de roer o lenho, praticando uma abertura circular por onde se passavam para o exterior. Naturalmente nesse caso a emergencia do adulto se retarda por algum tempo.

Depois da emersão, a qual se processa indiferentemente de dia ou de noite, os adultos mantem-se por algum tempo pouco ativos.

Os adultos de *C. dimorphus,* notadamente as femeas, são insétos ativos, de vôo elegante e não muito rapido, sendo moderadamente fototropicos positivos, fáto que concorre para o facil manuseio da especie.

Ambos os sexos alimentam-se facilmente de mel e açucar, puro ou em solução, mas os melhores resultados foram obtidos geralmente fornecendo-lhes como alimento uma solução concentrada de açucar e agua. As femeas, porém, além da solução, procuram invariavelmente alimentar-se de lagartas, durante toda a vida, a começar de certa fase durante o periodo de preoviposição, processo que se realiza do modo seguinte: tal como para a realização da postura, depois de localizar a lagarta, a femea entorpece-a e vagarosamente vae retirando o ovipositor. Nessa operação vem puxando a lagarta lentamente para o orificio ou fenda. Depois de algumas tentativas, consegue trazer a lagarta adatando-a á abertura. Retirando o ovipositor e voltando-se rapidamente, com o aparelho bucal, procura pega-la. Si o orificio é muito pequeno, não lhe permitindo agarrar a presa, dilata-o com as mandibulas até que possa segurar a lagarta e alimentar-se. Geralmente cada femea inutiliza 3 a 5 lagartas diariamente, para esse fim. Os machos utilizam-se dos restos deixados pelas femeas, presos á abertura, mas não preferem esse tipo de alimento. As femeas, enquanto estão sobre o local onde existam as lagartas, defendem-no contra outras que se aproximem. Mas geralmente, depois que os abandonam, os machos ou outras femeas aproveitam-se dos restos deixados pela primeira.

E' interessante observar que a maior atividade dessa especie coincide com o periodo postcultural.

Inicialmente aparece reduzido numero de adultos, no meiado da colheita, intensificando-se progressivamente até os mêses de Setembro e Outubro, para em seguida declinar de modo muito rapido em Novembro. Isso foi observado seguidamente por dois anos em algodoais que, contrariando a pratica normalmente adotada, de eliminação dos restos culturais, foram deixados no campo. Depois desses mêses os algodoais estavam em condições muito precarias, mas assim mesmo tinham

capulhos e lagartas em pequenas quantidades. No entanto, o parasita desaparecera completamente. Varias verificações conduzidas em alguns outros algodoais ainda existentes em outras regiões, e ainda diversas caçadas realizadas com rêdes, nas proximidades desses campos ou não, não deram resultados satisfatorios, pois nunca mais, até Maio, nas condições naturais, mesmo nos algodoais novos e já contendo numerosos capulhos atacados e abertos, foram obtidos adultos, do campo. Em laboratorio foi possivel conseguir que a especie atravessasse esses mêses quentes, não sem dificuldade, já devido á elevada porcentagem de mortes verificada nos adultos existentes nessa época, já em vista de, dada a nossa aparelhagem presente, não ser facil conservar maiores quantidade de *P. gossypiella* na sua fase larval durante os mêses de verão, para obtenção de lagartas em condições apropriadas no inicio do periodo cultural. Dadas as reservas de milhares de capulhos de algodão e quiabos atacados, armazenados durante a safra, foi possivel conseguir o minimo de lagartas para prosseguir os trabalhos nas épocas criticas.

A vida dos adultos, influenciada pela temperatura, manifesta que entre 18° C. e 21° C. medios parecem residir as condições mais favoraveis para a sua longevidade; quanto á oviposição, a temperatura de cerca de 26° C. parece intensifica-la sobremodo.

E' dificil atinar com a maneira porque *C. dimorphus* atravessa a época do estío. Com a temperatura elevada reduz-se o periodo de desenvolvimento, bem como a duração da vida adulta. Assim, dadas as observações procedidas, não acreditamos que uma fase estival em qualquer estadio possa ocorrer. Tambem fica reduzido ao minimo o numero de lagartas rosadas, pois nesses mêses os restos de culturas que ainda possam existir, encontram-se em pessimas condições, e normalmente os campos já têm novas plantações. Devido ao pequeno numero de adultos que se observa no inicio do seu aparecimento, talvez seja concebivel que uns poucos individuos consigam transpôr essa fase critica do ano, aproveitando-se das poucas lagartas porventura existentes numa vida latente, ou de outros hospedeiros. Esses originarão progressivamente, quando as condições se tornam mais adequadas, as maiores quantidades encontradas posteriormente, até o franco desenvolvimento da especie nos mêses de inverno.

Nas temperaturas abaixo de 16° C. os adultos manifestam pouca ou nenhuma atividade. Nas mangas de vidro onde se conservava maior numero dos parasitas reunidos, nos dias mais frios, pela manhã, as femeas mantinham uma posição uniforme, voltadas para baixo, assim permanecendo imobilizadas, até que a temperatura atingisse grão mais elevado.

Normalmente o periodo de desenvolvimento (tabela 4), tanto dos machos como das femeas, processa-se em tempo semelhante, tendo estas uma duração em média ligeiramente maior do que os machos.

## NUMERO DE GERAÇÕES

Em Maio aparecem os primeiros individuos nos algodoais. E, si bem que o aparecimento na primeira quinzena seja escasso e constituido principalmente de machos, na segunda, notam-se os adultos em maior abundancia. Póde-se assim considerar que o começo da sua existencia no campo se dê de modo praticamente regular. No entanto a pequena disparidade do aparecimento inicial, acrescida de alguns outros fatores, tais como certa desigualdade nas fases do desenvolvimento e longevidade dos adultos, irregularidade do periodo de preoviposição, etc., provocam determinadas variações, fazendo com que as gerações sucessivas não sejam inteiramente definidas, acontecendo que elas se entrecruzem, pelo acumulo progressivo dessas causas. Além disso e ainda devido á incerteza mantida com relação ao comportamento dessa especie nos mêses quentes e desfavoraveis, tornou-se impraticavel a determinação do numero de gerações para o periodo de doze mêses, nas condições naturais. Nessas condições, porém, determinou-se o numero de gerações correspondentes ao periodo em que foi possivel obter material proveniente do campo. Como ponto de partida para conseguir esse objetivo, tomaram-se como primeira geração os primeiros adultos conseguidos dos capulhos provenientes do algodoal na segunda quinzena de Maio. Considerou-se como uma geração completa o intervalo compreendido entre o adulto até a obtenção de novo adulto. Desse modo, seguindo-se a criação no insetario e comparando-a com individuos obtidos de condições naturais, segundo as observações procedidas, o numero de gerações, para o periodo compreendido entre Maio a meiados de Novembro, não deve exceder de quatro.

Em criações sob as condições do insetario, considerou-se como geração completa o periodo que vae de ovo até ovo. Partindo-se dos ovos conseguidos em Junho, provenientes dos adultos do campo, conseguiu-se obter oito gerações no prazo exáto de um ano. Deve ser compreendido que esse numero representa o maximo de gerações possiveis durante o periodo anual, baseado nas criações procedidas em condições anormais. O prazo necessario para completar-se cada geração variou conforme a época do ano. Iniciando em Junho, a primeira geração precisou de 45,1 dias; a segunda, 49 dias; a terceira, 42 dias; a quarta, 33,6 dias; a quinta, 38,4 dias; a sexta, 39 dias; a setima, 38 dias; e a oitava, 40 dias, em média.

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A EFICIENCIA E FATORES QUE LIMITAM A SUA AÇÃO

As informações que se seguem não são de nenhum modo suficientes para dizer do valor ou ineficiencia de *Calliephialtes dimorphus* como fator de combate biologico á *P. gossypiella*. A determinação da eficiencia de um parasita demanda maiores somas de verificações, o que presentemente não póde ser realizado.

O que foi feito prende-se principalmente aos dados obtidos em Campinas durante o periodo de um ano, si bem que em outros locais, porém em menor escala, fossem tambem registradas observações. Dessa maneira as referencias feitas servem tão só para fornecer uma indicação da especie.

Tendo sido a lagarta rosada introduzida no paiz, necessariamente o parasita extendeu a sua ação a esse novo hospedeiro.

Nas nossas condições, apesar da ampla distribuição por todas as regiões, essa especie não parece ter uma eficiencia proeminente com relação á lagarta rosada. Como geralmente acontece nos lugares de origem, existem diferentes causas que concorrem para a redução da eficiencia de um inimigo natural.

Em Campinas, onde, durante 1938, foram colhidos dados referentes ao parasitismo, a importancia é muito relativa si sómente se levarem em conta os numeros expressos na tabela 10. Esses dados porém não representam a real destruição das lagartas, pois não são aí computadas as que, devido aos habitos de alimentação das femeas, foram sacrificadas. A mais alta porcentagem de parasitismo coincide com o periodo em que as lagartas completamente desenvolvidas estão em condições de passar á fase de vida hibernal, carateristica favoravel ao parasita.

A capacidade de reprodução, a longevidade, comprimento do ovipositor, ciclo e atividade do adulto são outros tantos fatores que contribuem para valorisa-la, ao lado de não ter sido encontrado até presentemente nenhuma especie hiperparasita, como tambem pela facilidade com que *Calliephialtes dimorphus* se presta á criação em laboratorio.

Indubitavelmente, nas condições existentes, as causas que mais influem na limitação de sua eficiencia são a influencia que as temperaturas elevadas exercem na longevidade dos adultos, e a pratica do arrancamento e queima dos restos da cultura algodoeira.

Em temperaturas médias superiores a 23° C. reduz-se sensivelmente a longevidade (tabelas 2 e 3). E' esse fato verificado nos mêses de verão, quando parece improvavel existir qualquer forma de vida

estival, já nos adultos, já nas formas imaturas. Durante todo o periodo em que a lagarta ataca as partes florais ou mesmo depois, até Maio, nunca foi possivel constatar a existencia de parasitismo por *C. dimorphus*.

Com a pratica generalizada do arrancamento e queima das soqueiras, que normalmente coincide com o periodo de grande atividade desse inimigo natural, elimina-se não só um grande volume de individuos como reduz-se a pouquissimas as areas onde, sobre algodão, essa especie encontre ambiente favoravel á sua criação. Salvo outros hospedeiros, *Myelois decolor,* atacando café, não fornece igualmente meios favoraveis, porque a sua existencia em cafesais coincide com a da lagarta rosada em algodoais, e a colheita e as medidas profilaticas adotadas para combater a bróca do café *(Stephanoderes hampei* (FERR.)) contribuem tambem para a redução desse hospedeiro.

TABELA 10

Porcentagem de parasitismo por *C. dimorphus* em *Platyedra gossypiella* em Campinas durante 1938

| Data da colheita de capulhos | N. de capulhos atacados por *P. gossypiella* | N. de lagartas encontradas | Média de lagartas por capulho | N. de parasitas obtidos | % de parasitismo |
|---|---|---|---|---|---|
| 27- 4-38 | 998 | 4.690 | 4,70 | 0 | 0,0 |
| 12- 5-38 | 985 | 3.329 | 3,38 | 4 | 0,12 |
| 17- 6-38 | 998 | 2.455 | 2,46 | 9 | 0,36 |
| 17- 7-38 | 636 | 1.781 | 2,80 | 12 | 0,67 |
| 17- 8-38 | 917 | 1.926 | 2,10 | 32 | 2,61 |
| 17- 9-38 | 1.456 | 3.640 | 2,50 | 99 | 2,71 |
| 18-10-38 | 701 | 1.402 | 2,00 | 54 | 3,85 |
| 17-11-38 | 847 | 1.508 | 1,77 | 32 | 2,12 |

No periodo de sua maior atividade a especie considerada não sofre concorrencia de outras especies, porque as demais, mais frequentes no inicio do periodo cultural, reduzem-se muito no ultimo periodo em que as plantas permanecem nos campos.

O periodo de preoviposição, um tanto extenso, póde ser considerado como um fator de limitação; mas considerando-se que durante esse periodo as femeas exercem uma ação predadora pronunciada em sua ultima metade, certamente fica muito reduzida essa condição desfavoravel.

BIOLOGY OF "CALLIEPHIALTES DIMORPHUS CUSHM." (HYM. ICHN.)
AN INTERESTING PRIMARY PARASITE OF "PLATYEDRA GOSSYPIELLA (SAUNDERS)"


### *Abstract*

*The ichneumonid Calliephialtes dimorphus* CUSHMAN, *recently described from specimens taken at Campinas, São Paulo, is a primary external parasite of the pink bollworm Platyedra gossypiella (*SAUNDERS). *It is widely distributed in S. Paulo and has been found to occur in the States of Minas Gerais, Rio de Janeiro and Espirito Santo. The species has also been reported from Myelois decolor* ZELLER, *and under laboratory conditions the female individuals accepted different types of larvae, but on only those of Leucinodes elegantalis* GUEN. *was it possible to rear the insect to maturity.*

*Calliephialtes dimorphus is easily handled in captivity and it may be propagated in the laboratory with relative facility. Details on methods used in these biological studies are presented. The adult insects are quite robust and they may be included among the larger species known to parasitize the pink bollworm. Morphologically the sexes are similar, but they differ in coloration. Little variation in size exists among individuals of the same sex, and the proportion of males is constantly greater than that of the females.*

*Data is also presented on longevity records. A concentrated solution of sugar and water proved to be the most satisfactory of various foods that were offered to adults of C. dimorphus. An average longevity of approximately 48 days was obtained for females provided with this type of food. The influence of temperature was considered for all stages of the insect. Temperatures exceeding 23° C. were unfavorable for the adult parasites, and this was a factor in reducing their longevity.*

*Mating occurs under the most varied conditions and may be repeated several times. The average preoviposition period was 14.60 days, being slightly longer for unmated females. When 8 days of age, the female parasite begins to sting and feed on pink bollworm larvae. The average oviposition period was 31.6 days, and the average number of eggs laid per female was 3.18 a day. The largest number deposited by one female was 19 on one day. The maximum number of eggs laid was 369 during the lifetime of one individual. Normally one egg is deposited on the pink bollworm, but under insectary conditions as many as 8 were obtained on a single larva. Of these never more than one parasite ever reached maturity.*

*Descriptions of the immature stages, development and habits of the species are presented in this paper. The time required for an indi-*

*vidual to complete its development from egg to adult depends largely on temperature and food supply. At 24° C. development was completed in about 18 days, the female sex requiring somewhat longer than the male. In the insectary 8 generations were completed in one year, but in the field no more than 4 are possible, owing to conditions of the cotton crop. Adult parasites appear during the early winter season in May, and are present in relative abundance throughout the cooler months. In the summer months the species has not been observed in the field. It is of interest to note that during the course of these investigations there were no indications of a possible diapause period which might account for its absence during the warmer months.*

*The efficiency of Calliephialtes dimorphus as a factor in the control of the pink bollworm has only been valuated superficially in the vicinity of Campinas. The considerations given in this paper may, therefore, not seem to present a true idea of its real efficiency. The habit of the adult insect to feed on the bollworm larvae and especially the more mature forms during the hibernation period, together with other characteristics, would probably indicate that it may prove a more promising parasite. There are, however, certain important factors which undoubtedly reduce its efficiency, among which may be cited the influence of high temperatures, as well as the practice of burning the crop remains. Such conditions are certainly detrimental to any attempt to intensify the species in a given area.*

*No hyperparasites of C. dimorphus have been encountered up to the present time.*

———o———

## EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA 27

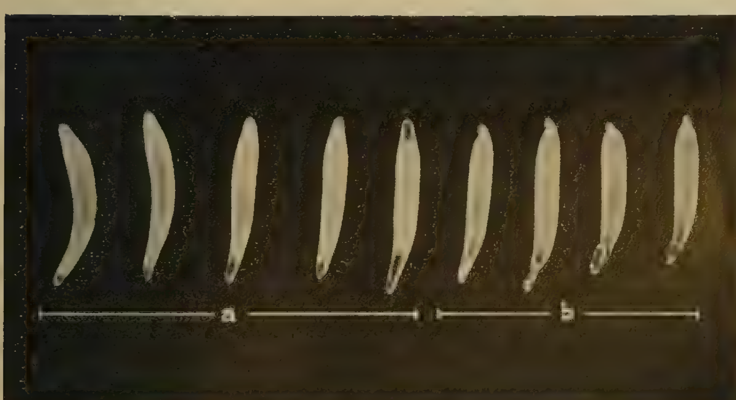
Fig. *A* — Mangas de vidro onde foram mantidos os adultos de *C. dimorphus* (E. J. HAMBLETON, fot.)

Fig. *B* — Ovos de *C. dimorphus,* mostrando as diversas fases da sua evolução x 12,5 (Autor, fot.)

———o———



*A*




*B*

Vol. 10 — Art. 11 Dezembro de 1939

# "ELSINOË THEAE n. sp.", AGENTE DA VERRUGOSE DO CHÁ

POR

A. A. Bitancourt e Anna E. Jenkins

Do Instituto Biologico e do Bureau of Plant Industry, Dept. of Agriculture, Washington

Com as estampas 28-29

Em Julho de 1938 encontrou o primeiro autor um fungo do genero *Elsinoë* em folhas maduras, doentes, de arbustos de chá *(Thea sinensis* L.) cultivados na Cantareira, nos terrenos da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico do Estado de São Paulo (Est. 28, *A*). As folhas doentes tinham um aspeto caracteristicamente sugestivo da doença descrita por PETCH sob o titulo de *Scabbed leaves,* em seu livro sobre as doenças do chá em Ceilão (6). A doença fora observada em 1937, nas mesmas plantas, na Cantareira, por H. S. FAWCETT que a assinalou ao primeiro autor. Nenhuma frutificação entretanto, foi então observada em cortes feitos nas folhas atacadas.

PETCH que observou a doença pelo menos desde 1917 conforme mostra um dos especimens citados abaixo, indica que a doença é comum em Ceilão, mas só chama a atenção depois que as folhas ficam velhas e o aspéto caracteristico das lesões se torna bem aparente. Na sua cuidadosa descrição das folhas atacadas, tanto novas como velhas, ainda informa que as manchas, que são angulares ou irregulares, com margem lobada, são a principio de côr verde amarelada, passando em seguida para marron escuro e depois, preta. Essas manchas, geralmente numerosas e que podem coalescer, cobrindo toda a folha, tornam-se salientes e quebradiças, fendilham-se, e podem ficar de côr cinzenta, o que tambem sóe acontecer com a totalidade da superficie da folha atacada, em torno das manchas. A coloração preta das manchas não se estende á face inferior da folha, onde, nos estagios avançados, vêm-se pequenas pontuações translucidas, de côr verde.

Ainda de acordo com PETCH, em secções transversais das folhas atacadas, vê-se que as áreas pretas são devidas á divisão das celulas em palissada e a um espessamento excepcional da membrana celular da parte superior dessas celulas, o que tambem é a causa da consistencia quebradiça que a folha assume. O fenomeno é, até certo ponto, normal, porque se produz em folhas sãs que igualmente se tornam quebradiças quando envelhecem, mas é mais precoce nas áreas pretas, antes do

resto dos tecidos ainda sãos alcançar esse estado. O conteúdo das células das áreas pretas é de côr purpurea, a principio, tornando-se marron escuro nas folhas velhas (1).

Por gentileza do Dr. C. H. GADD, diretor do Tea Research Institute, de St. Coombs, Talawakele, Ceilão, o segundo autor poude examinar os especimens (Est. 29, *A-D*) da coleção micológica de PETCH em Ceilão. O seu estudo revelou a presença de frutificações de um fungo pertencente ao genero *Elsinoë*. Está portanto estabelecida a causa até agora desconhecida, da doença de Ceilão.

As típicas lesões hiperplásticas descritas por PETCH e representadas na est. 29, *H*, foram verificadas num especimen de Ceilão colhido pelo Dr. GADD em Abril de 1939. Essas lesões têm uma estrutura histológica assás semelhante ás produzidas em *Citrus* por *Elsinoë fawcetti* BITANCOURT e JENKINS que foram descritas por CUNNINGHAM (4) e BUTLER (3).

Na Cantareira foram feitas culturas monoascospóricas de *Elsinoë* a partir das lesões das folhas velhas de um especimen colhido em Julho e culturas de tecido das lesões das folhas novas e velhas de outro colhido em Novembro. Essas tres culturas (est. 28, *G-I*) são muito parecidas, embora apresentem pequenas diferenças entre si. Bem que semelhantes, nos seus caracteres gerais, a culturas de outras especies do mesmo genero (5, fig. 5), possuem caracteres distintivos que permitem separa-las dessas últimas.

---

(1) O texto original, completo, de Petch, é o seguinte:

SCABBED LEAVES

This disease is common in Ceylon, more especially on the older leaves of the bush. Apparently it does not attack the flush, but it may begin on leaves which are just full grown, though it does not attract much attention until the leaves are old and the characteristic appearance is well developed.

The affected leaves at first bear yellowish-green spots, which become blackish brown, and then black. These spots are angular or irregular, or have a lobed, cloud-like margin. A single spot, in the early stages, may exhibit all the three colours and appear mottled. They are usually numerous, and vary considerably in size; ultimately they may coalesce and cover the whole leaf (Plate I., Fig. 7).

At first the spots appear merely as a discoloration of the leaf. As they grow older they become elevated above the surrounding parts of the leaf, and the leaves bulge upward between the veins and become brittle. The blackened areas crack, and the cracks turn grey. In some cases the whole of the blackened spot turns grey, while in others the same grey coloration extends over the surface of the leaf round and between the spots. In the latter case, however, the discoloration of the part of the leaf which was not blackened is often due to the secondary attack of Grey Blight, or *Guignardia*. The final result is usually a large, irregular spot, extending over a great part of the leaf, intermingled black and grey, and irregularly blistered and cracked (Plate I., Fig. 8).

The black colour does not, as a rule, extend to the lower surface of the leaf. In advanced stages, the under surface may bear minute, watery-green translucent dots, and sometimes a few black points.

Sections through the affected leaves show that the elevation of the blackened areas is due to a division of the palisade cells and an exceptionally strong thickening of the cell walls at the upper ends of the same cells. The brittleness of the affected leaves is also due to this development.

To some extent this cell division is normal; it takes place in old leaves of tea, and for that reason the older leaves are brittle. But in these "scabbed" leaves it occurs prematurely in the blackened areas, while the unaffected parts of the leaves are still in the younger condition, and the thickening of the cell walls is much more strongly developed than in normal leaves. In the young stages the cells of the blackened areas have purple contents, but when old the cell contents are brown.

The cause of this disease is not known. No fungus has yet been found in the diseased spots. In some respects the spots resemble those caused by *Discosia Theae*, as figured by Spechnew, but no such fungus occurs on these spots in Ceylon. Up to the present it has not caused serious damage.

A descrição técnica dessa nova especie de Ceilão e do Brasil é a seguinte:

*Elsinoë theae* n. sp. Manchas das folhas epífilas, ou apenas visiveis na face inferior, pequenas, pretas, redondas, ligeiramente proeminentes ou pulvinadas, com superficie superior plana, frequentemente localisadas na região apical do limbo, envolvidas, posteriormente, de uma zona seca, branco-acinzentada, nitidamente deprimida; espalhadas, com 0,2 a 2 milimetros de diametro, ou então, e mais habitualmente, coalescentes, em grandes áreas irregulares, mosqueadas, que podem ocupar a quasi totalidade da superficie da folha; os tecidos atacados tornam-se quebradiços e formam extensas fissuras ou fendas, que entretanto não atravessam toda a espessura dos tecidos nem alcançam a face inferior da folha; nas áreas acinzentadas distinguem-se pontuações escuras, geralmente de côr pardo-escura, espalhadas ou distribuidas em circulos mais ou menos concentricos e que são os ascomas do fungo causal.

Vistos com microscopio binocular os ascomas apresentam-se, nas áreas acinzentadas, como pequenas massas proeminentes, e em secção mostram-se pulvinados, intraepidérmicos, bem delimitados dos tecidos do hospede, praticamente sem nenhum tecido prosenquimático desenvolvido entre as células do hospede, e com poucos filamentos micelianos visiveis na camada de células em palissada, por baixo da epiderme; medem 200 - 300 $\times$ 15 - 18 $\mu$ e são feitos de um pseudoparenquima pardo-claro, constituido por células poligonais, de paredes relativamente espessas, e aproximadamente com 4 $\mu$ de diametro, geralmente homogeneo, ocasionalmente, porém, com uma camada externa ou epitecio feito de células mais achatadas; ascos espalhados no pseudoparenquima, geralmente distribuidos numa camada irregular, sendo alguns aparentemente empurrados por cima ou por baixo dessa camada e deformados; os ascos medem 14 - 22 $\times$ 12 - 20 $\mu$, têm parede interna mais espessa na parte superior, e contêm até um total de 8 ascosporos; ascosporos hialinos, medindo 10 - 14 $\times$ 3 - 7 $\mu$, munidos de 3 septos e constritos no septo mediano, com as duas células superiores mais curtas e grossas do que as inferiores, e frequentemente com septos longitudinais em uma ou mais das células medianas e superior; microconidias numerosas, dentro do pseudoparenquima do ascoma, esféricas, hialinas, com 0,5 - 1 $\mu$ de diametro.

Em meio de cultura de batata-dextrose-agar (2), o fungo forma um talo de crescimento lento, compacto, convoluto, saliente, que, com um mês de idade é principalmente côr de canela *(cinnamon* (3)) e com cinco mêses mostra tres zonas de crescimento, a mais velha tendo côr parda *(fawn color)*, a seguinte parda alaranjada *(orange cinnamon)* e a mais nova parda escura *(army brown)*.

*Maculis foliicolis, plerumque epiphyllis, parvis, nigris, rotundis, conspersis, 0,2 mm. in diam., frequenter in areas largas confluentibus; ascomatibus pulvinatis, intraepidermicalibus, 200-300 $\times$ 15-18 $\mu$, pseudoparenchymatibus, homogeneis vel interdum epithecio e cellulis compressis composito; ascis conspersis, plerumque in stratum unicum irregularem dispositis, interdum dense stipatis et deformatis, apice incrassatis, octosporis, 14-22 $\times$ 12-20 $\mu$; ascosporis 10-14 $\times$ 3-7 $\mu$, hyalinis, 4-cellulatis, cellulis centralibus longitudinaliter septatis, medio constrictis, cellulis superioribus latioribus et brevioribus; microconidiis numerosis, sphaericis, hyalinis, 0,5-1 $\mu$ in diam..*

---

(2) A formula para esse meio de cultura padrão é dada sob o nome "formula A" em outro trabalho dos autores (2).

(3) As côres são indicadas aproximadamente, em português. A indicação precisa em inglês, é baseada em: Ridgway, R. Color standards and color nomenclature. 43 pp. 1912.

Especimens examinados:

Ceilão: Hunasgeria, Agosto de 1917, T. PETCH (N.º 5330a Herb. Ceylon Dep. Agric. Peradeniya); Mahaousa, Janeiro de 1922, T. PETCH (N.º 6366 Herb. Ceylon Dept. Agric. Peradeniya); Kotagalla, Abril de 1939, C. H. GADD (N.º 280 Tea Research Institute of Ceylon).

Brasil: Estado de São Paulo, Cantareira, 18 de Julho de 1938 (Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo, n.º 2970 e Coleções Micológicas do Bureau of Plant Industry, n.º 74037 (tipo)) e 8 de Novembro de 1938. (Herbario da Secção de Fitopatologia do Instituto Biologico de São Paulo, n.º 3061).

"ELSINOË THEAE n. sp." CAUSING SCAB OF TEA

*Abstract*

*An Elsinoë has been found on scabbed leaves of tea (Thea sinensis L.) growing at Cantareira, São Paulo, on the grounds of the Phytopathological Division of the Instituto Biologico de São Paulo. The same fungus has been found on scabbed leaves of tea discovered in Ceylon by Petch, and the organism is described as E. theae. Ascospore and tissue culture isolations were made.*

## BIBLIOGRAFIA


1 — Bitancourt, A. A. e Jenkins, A. E. — 1936 — Elsinoë fawcetti, the perfect stage of the citrus scab fungus. *Phytopathology,* **26**: 393-396, ilus.

2 — Bitancourt, A. A. e Jenkins, A. E. — 1939 — Novas especies de Elsinoë e Sphaceloma sobre hospedes de importancia economica. *Prim. Reun. Sul-Americana de Botanica* (Rio de Janeiro). No prelo.

3 — Butler, E. J. — 1930 — Some aspects of the morbid anatomy of plants. *Ann. Appl. Biol.,* **17**: (175-212), ilus.

4 — Cunningham, H. S. — 1928 — The histology of lesions produced by Sphaceloma fawcetti Jenkins on leaves of citrus. *Phytopathology,* **18**: 539-545, ilus.

5 — Jenkins, A. E. — 1931 — Development of the citrus-scab organism, Sphaceloma fawcetti. *Journ. Agr. Research,* **42**: 545-558. ilus.

6 — Petch, T. — 1923 — The diseases of the tea bush. 220 p., London.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 28

*A-F, Elsinoë theae* sobre folhas de *Thea sinensis* provenientes de plantas da Secção de Fitopatologia, Cantareira, São Paulo. Col. A. A. Bitancourt, 1938. As folhas *A,* colhidas em 8 de Novembro, mostram a fase inicial, ao passo que a folha *C,* colhida em 18 de Julho, mostra uma fase mais adiantada. Ambas × 1. *B*, detalhe de *A,* × 5; *D,* detalhe de *C,* × 5. *E,* Secção transversal do especimen representado em *C,* mostrando as frutificações (*a*) formadas no tecido epidérmico; *b* e *c,* ascos, vendo-se nitidamente os ascosporos em *b; d,* parede superior da epiderme rompida; *e,* tecido em palissada, da folha. *F,* ascos (*a, c*) e ascosporos (*b, d*). O asco em *c* contem um unico ascosporo com a célula mediana inferior e a célula superior munidas de um septo. Tudo × 500. *G, H e I.* Culturas em meio de batata-dextrose-agar de um ascosporo do especimen colhido em Julho (*G*) e de culturas de tecido de lesões novas (*H*) e velhas (*I*) do especimen colhido em Novembro. Tudo × 1.

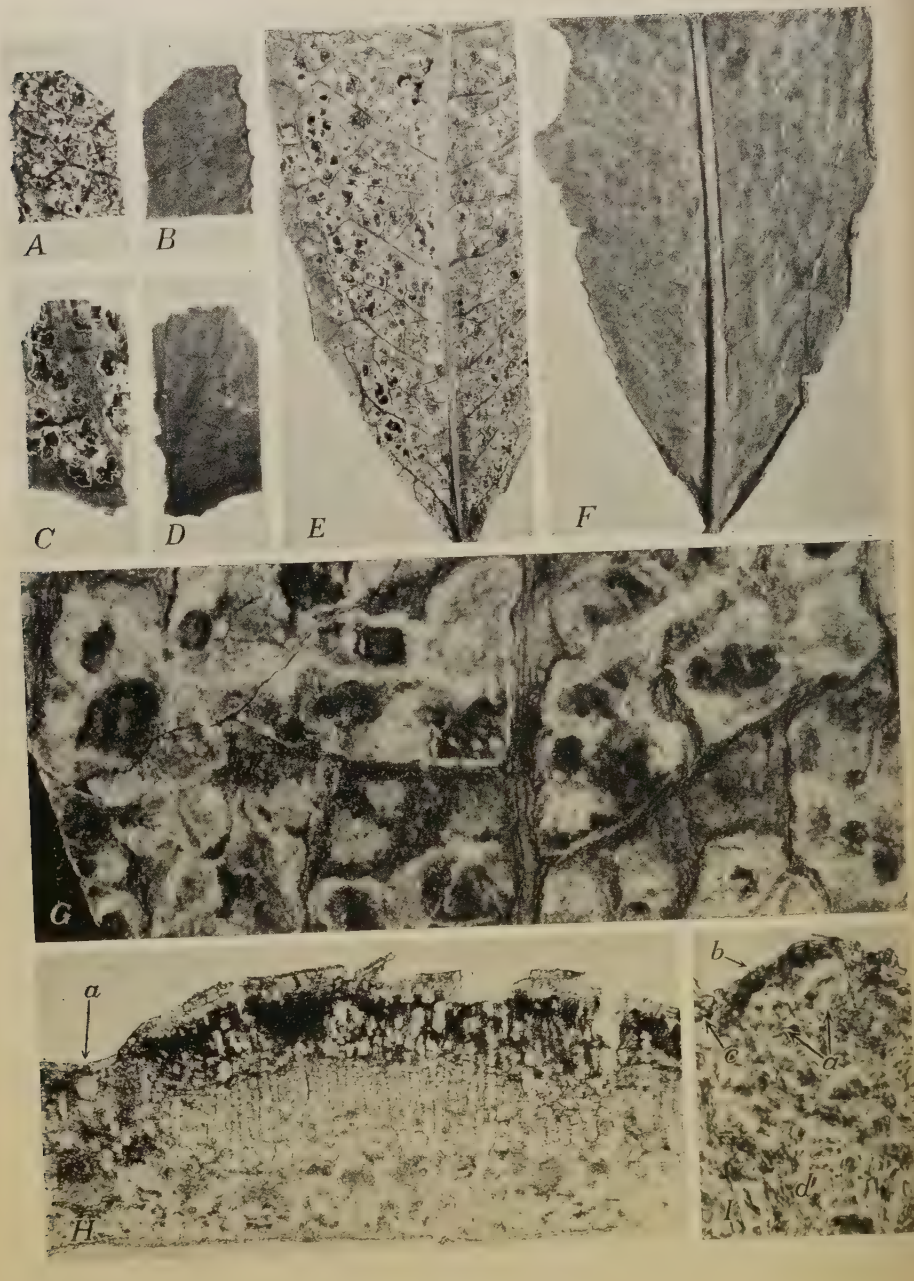
Fotografias por Bitancourt e Rodrigues.

### Estampa 29

Especimens de herbario de *Elsinoë theae* provenientes de Ceilão, cedidos pelo Dr. C. H. Gadd. *A* e *B,* colhidos por Petch em Hunasgeria, em Agosto de 1917, e *(C* e *D)* em Mahaousa, em Janeiro de 1922; *E* e *F,* colhido em Kotagalla, em Abril de 1939, pelo Dr. Gadd. Tudo × 1. *G,* parte de *A* × 10. *H,* Secção de lesões de *E* mostrando a deformação dos tecidos da folha descrita por Petch; *a,* superficie superior da folha. × 70. *I,* corpo frutifero de *A; a,* dois ascos (contendo ascosporos imaturos, invisiveis na fotografia); *b,* camada externa escura da frutificação; *c,* epiderme superior; *d,* tecido em palissada da folha. × 500.

Fotografias por M. L. F. Foubert.


A
C
a
d
d
d
b
c
E
e
a
b
d
F
c
G
H
I


A
B
C
D
E
F
G
a
H
b
c
a
d'
I

Vol. 10 — Art. 12 Dezembro de 1939

# NOTAS SOBRE "ELASMOPALPUS LIGNOSELLUS ZELLER" (LEP. PYR.), SÉRIA PRAGA DOS CEREAIS NO ESTADO DE SÃO PAULO

POR

H. F. G. Sauer

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com as estampas 30-31

## INTRODUÇÃO

Em fins de Novembro de 1938, por intermedio do Dr. S. Bonilha, da Secção do Fomento da Secretaria da Agricultura, recebemos do Snr. E. Henrique uma carta na qual transmitia queixas e solicitava medidas urgentes capáses de restringir os prejuizos vultosos que os orizicultores do municipio de Ituverava estavam sofrendo, em virtude de um grande ataque ás plantações novas, por uma pequena lagarta.

Nessa ocasião procurámos observar as culturas e verificámos que infelísmente o pedido fôra encaminhado demasiadamente tarde para ser tomada qualquer providencia de momento, porquanto os estragos já haviam sido produzidos, em muitos locais, de maneira radical.

Apesar de *Elasmopalpus lignosellus* já haver sido consignado em nossa literatura, não conhecemos informações mais detalhadas acerca do comportamento dessa espécie sob as nossas condições. Sendo um inséto muito difundido e encontradiço em diferentes mêses, e principalmente por constituir uma praga de importancia economica, notadamente para as culturas de cereais, julgamos oportuno divulgar as notas que seguem, constituidas de observações processadas ligeiramente no decurso de tres anos, e mais atentamente por ocasião do surto verificado na região mencionada e vizinhanças.

Nessa zona, cujas culturas são feitas comumente por pequenos ou medios plantadores e que se extendem para o Estado de Minas Gerais, os arrozais são, com raras exceções, cultivados em terrenos altos, não sendo empregada usualmente a irrigação.

## CONSTATAÇÃO DA ESPECIE E CONSIDERAÇÕES SOBRE A SUA IMPORTANCIA ECONOMICA NO BRASIL

E. J. Hambleton e W. T. M. Forbes, em 1935 em «Uma Lista de Lepidopteros do Estado de Minas Gerais», publicada nos «Arquivos do Instituto Biologico» de São Paulo, vol. 6:213-256 *cf.* p. 248, constatam a ocorrencia dessa especie em Viçosa, nos anos de 1929-934. Na mesma localidade, e no ano dessa publicação, tivemos oportunidade

de verificar os danos produzidos por tal praga em certos pontos de um milharal nos terrenos da Escola Sup. de Agricultura e Veterinaria, ocasionando falhas, por vêses grandes, nas plantações ainda novas. Em 1936 os Drs. P. Cuba e J. A. Nucci, do Instituto Agronomico do Estado, em Campinas, comunicaram que as plantações de milho e feijão sofriam anualmente as consequencias do ataque de uma pequena lagarta. L. O. T. MENDES, entomologista da mesma instituição, teve em 1937 ocasião de referir-se a *Elasmopalpus lignosellus* como o causador dessas perdas, apontando a sua distribuição por outras regiões de São Paulo, e publicando na «Revista de Agricultura», XIII (10-11-12): 482-490, Piracicaba, Dezembro de 1938, uma «Relação de insétos encontrados sobre plantas no Estado de São Paulo nos anos de 1936-937», na qual menciona simplesmente tal especie sobre milho e feijão.

Finalmente, em Novembro de 1938, constatámos a sua ocorrencia como uma verdadeira praga dos arrozais, em proporções como anteriormente nunca viramos ou tiveramos conhecimento.

Antes desse surto, segundo as informações expressas por lavradores, nos ultimos quatro anos já vinham sendo notados estragos de pequeno vulto, que têm vindo aumentando progressivamente de ano para ano.

Será dificil, presentemente, aquilatar-se a importancia dessa especie como praga pelo menos de tres das nossas principais culturas, porque, apesar de considerada prejudicial nas atuais condições por anos seguidos, nada foi feito para avaliar a extensão dos seus prejuizos. Com exceção dos dados obtidos em 1935 em Viçosa, em que as falhas provocadas num milharal novo de 3 Ha. corresponderam aproximadamente á quinta parte, e da ligeira informação dos Drs. CUBA e NUCCI, os quais a consideram bem prejudicial ás culturas de milho e feijão, nada mais temos sinão as notificações feitas no plantio de 1938, e ainda assim, quanto a uma unica zona e sobre uma só especie de cultura. Nas propriedades percorridas em Ituverava e vizinhanças, as quais perfazem englobadamente cerca de 183 Ha., o prejuizo total verificado nas areas cultivadas com arroz, foi aproximadamente de 105 Ha; nos 78 Ha. restantes houve um prejuizo aproximado de 25 %. A extensão dos prejuizos não se limitou ás áreas percorridas; soubemos que diversas outras plantações foram atacadas nessa região, assim como na zona Norte do Estado, onde os arrozais foram notavelmente infestados. Ha alguns anos, na zona litoral sul, os arrozais sofreram grandes perdas por uma lagarta que, pelas caracteristicas fornecidas, supomos tratar-se tambem de *lignosellus.*

A manifestação dessa especie vem tendo ultimamente um carater constante, contribuindo para perdas sensiveis em diferentes zonas, dei-

xando aparentemente de ser eventual, como ocorria dantes. Si prejuizos semelhantes aos verificados em Ituverava e circunvizinhanças continuarem a ocorrer, constituirá essa especie, nas nossas condições, uma das pragas mais importantes dessa cultura.

## DISTRIBUIÇÃO GEOGRAFICA E PLANTAS HOSPEDEIRAS

Essa especie, já constatada desde o norte dos Estados Unidos, mais abundantemente nos Estados do sul, até o Chile, incluindo as Antilhas, tem, por conseguinte, uma vasta área de distribuição. Aparentemente, no Brasil, além dos Estados de Minas e São Paulo, onde de fáto foi encontrada prejudicando as lavouras, é de supôr que a sua difusão seja extensiva aos demais Estados, embora não se tenham feito pesquisas nesse sentido, nem se conheça a sua existencia em outras localidades danificando culturas. Em São Paulo verificou-se a ocorrencia do inséto em toda a sua área, excetuadas as partes oeste e noroeste, onde não se pesquisou. Em surto evidente e de consequencias prejudiciais, o seu aparecimento manifestou-se mais claramente nos municipios de Ituverava e vizinhos, e mais secundariamente nas zonas de Campinas e Norte do Estado.

As plantas hospedeiras cultivadas, atacadas por essa especie e consignadas no país até presentemente, restringem-se principalmente ás familias das Gramineas e Leguminosas. Dentre as primeiras citam-se o milho, o arroz e o sorgo, além de diversas especies de capins encontrados nas proximidades das culturas infestadas; e da segunda, os diversos feijões. E. J. HAMBLETON, em algodoais adjacentes á cultura de milho, encontrou-a atacando essa Malvacea.

Outras plantas foram encontradas hospedando a praga. P. LUGINBILL e G. G. AINSLIE, em «The lesser corn stalk borer», U. S. Dept. Agr. Bull. 539, 1917, constata-a, além das especies citadas, sobre ervilhas, amendoins, nabos, trigo, cana de açucar, *Cyperus esculentus* e diversos capins ou gramas. Em Cuba, H. K. PLANK, em «The lesser corn stalk borer *(E. lignosellus* ZELL.) injuring sugar cane», publicado no Jour. Eco. Ento., vol. 28(2): 413-418, 1928, menciona ainda *Valota insularis*.

## NOTAS SOBRE A BIOLOGIA

### ADULTO E O SEU APARECIMENTO

Os adultos de *Elasmopalpus lignosellus* ZELLER medem de 15 a 25 mms. de envergadura. São pequenos, inconspicuos e, quando em repouso, suas asas ficam ao longo do corpo. A coloração dos machos é pardo-amarelada e das femeas pardo-escura ou cinza, si bem que se observem comumente, dentro do mesmo sexo, tonalidades diferentes.

Ficam pousadas no solo ou sobre as plantas e, ao aproximar-se alguem delas, alçam vôo, rapido e curto.

Em Campinas, os primeiros adultos apareceram, na lús, no dia 24 de Agosto de 1938 e, em 17 do mesmo mês, em 1939. Segundo Hambleton e Forbes, no trabalho citado, em Viçosa a constatação prolongou-se desde Setembro até Novembro, por um periodo de cinco anos consecutivos. Em Ribeirão Preto, Ituverava, Igarapava e Franca, nos mêses de Novembro e Dezembro na ultima cultura, nos campos, durante o dia, e na lús, á noite, viam-se os adultos em grandes quantidades, notadamente nos arrozais novos. Nessa ocasião os danos já estavam feitos e as plantas sobreviventes mais raramente mostravam sinais de ataque. Em Ribeirão Preto e Campinas presenciou-se ao aparecimento de *Elasmopalpus lignosellus,* na lús, até Abril, sendo o ultimo adulto constatado nessa ultima localidade em 28-4-939.

### OVIPOSIÇÃO

As femeas criadas, acasaladas e postas em mangas de vidro com plantas, efetuaram a postura satisfatoriamente. Num periodo de 16 dias, a postura de 3 femeas foi de 387 ovos, numa média individual de 129.

Os pequenos ovos, em média com 0,6 mms. de comprimento por 0,364 mms. de largura, de coloração creme, levemente esverdeados com o corion reticulado e irizado, são depositados isoladamente nas folhas, bainhas ou hastes das plantas. Durante a incubação, que se processou em começos de Dezembro, em cinco dias geralmente, o ovo passa a róseo e, no têrmo desse periodo, a vermelho.

### LAGARTA E CICLO DA VIDA

A lagarta recem-nascida, de cabeça parda e escudo do primeiro segmento toracico tambem pardo, porém mais claro, tem os demais segmentos do corpo, dorsalmente, avermelhados na metade posterior, excéto o primeiro toracico, que é alaranjado e o primeiro abdominal, inteiramente avermelhado. Todo o corpo é provido de cerdas delicadas. O comprimento é de 1,58 mms. e a largura (tomada no 3.º toracico) de 0,184 mms., com a capsula da cabeça medindo cerca de 0,22 mms. de largura. Não são muito ativas, sendo comum encontrarem-se as lagartinhas suspensas pela teia ligada ás folhas.

Em laboratorio, alimentaram-se inicialmente das proprias folhas do arroz, mas do total de 127 lagartinhas, sómente duas sobreviveram, conseguindo atingir o segundo estadio. Nessa fase a cabeça é preta, ou quasi, com muitas pontuações, medindo 0,48 mms. de largura. O corpo, amarelado, é dotado de cerdas pardas e curtas, com a extremi-

dade globular. Como os precedentes, esses dois individuos morreram, e apesar de outras tentativas, não se conseguiu que ultrapassassem esse estadio. Lagartas maiores, mas em diversos estadios, trazidas do campo em fins de Novembro, postas em placas onde previamente foram transplantadas pequenas plantas de arroz, prosseguiram o desenvolvimento, comportando-se semelhantemente ás das culturas.

Quando completamente desenvolvidas, as lagartas dessa especie medem cerca de 1,5 cms. de comprimento. São delicadas e muito ativas; têm a cabeça pequena, pardo-escura ou quasi preta, sendo de côr identica o escudo do 1.º segmento do torax. Conquanto seja um pouco variavel, a coloração do corpo predominante dorsalmente é a verde-azulada, tornando-se mais clara lateralmente. No dorso e nos lados, transversalmente e mais para a região posterior de cada segmento, notam-se listas pardo-escuras ou purpuras, um tanto franjadas com linhas da mesma côr.

Finda a fase larval, as lagartas tecem o casulo, que se póde localizar no tubo de seda proximo da base da planta ou nas proximidades desta no sólo; nunca porém foi observada essa transformação dentro da galeria feita no hospedeiro.

O casulo é resistente, tecido com teia fina e cinzenta, todo envolvido externamente com particulas de terra ou detritos vegetais, assemelhando-se a um pequeno torrão, dificilmente distinguivel no terreno.

Cerca de dois dias depois de construido o casulo, verifica-se a transformação em crisalida.

As lagartas colhidas no campo em Novembro concluiram, no laboratorio, o periodo de alimentação entre 8 e 15 dias, precisando de 8,5 dias, em média, para completarem o estadio ninfal, em Dezembro.

### HABITOS E NATUREZA DO ATAQUE

Quando as plantas são novas e atingem cerca de 12 cms. de altura, entre 15 e 25 de Novembro, é que se manifestou intensamente o ataque, nos arrozais da zona considerada. Antes dessa época, segundo informações obtidas, os danos não se evidenciaram, nem depois se podia encontrar nas culturas grande abundancia de lagartas. Evidentemente, iniciando-se a infestação mais cêdo, sómente nessa época manifestaram-se os prejuizos. No entanto o ataque diminuiu de tal modo, depois disso, que em fins de Novembro e principios de Dezembro dificilmente se encontravam as lagartas, e posteriormente, em meiados deste mês, só eventualmente a praga atacava as plantas mais retardadas.

Conforme os dados sobre o ciclo da vida obtidos em Dezembro, é possivel que a atividade dos adultos se tenha tornado intensa de

fins de Outubro em diante, e, assim, os maiores estragos coincidiram com as datas mencionadas.

Na região da planta situada na superficie ou pouco abaixo da superficie do sólo é onde se dá o inicio do ataque. Enquanto se alimentam, as lagartas vão construindo uma galeria pelo centro da haste, que vae aumentando á medida que ela se desenvolve, provocando finalmente a morte do vegetal. Quando a planta começa a se ressentir, nota-se primeiramente um amarelecimento, seguido da murcha das folhas internas, e finalmente a murcha e séca de toda a planta.

Observou-se uma galeria unica por planta; e a lagarta não permanece constantemente dentro dela. As lagartas constroem abrigos, misto de teia e terra ou outros detritos, que se unem á abertura do orificio. De comprimento variavel, esses tubos estão, ás vêzes, imediatamente sob a superficie, mas geralmente encaminham-se obliquamente para maiores profundidades. Logo abaixo da superficie do sólo, ao se arrancarem as plantas infestadas, encontram-se normalmente, no orificio da galeria, excrementos e tambem fragmentos desse abrigo. Raramente se consegue trazer tambem o esconderijo e com ele a lagarta. E' que, por ser muito delicado, ele se parte facilmente e a lagarta, rapida em seus movimentos, logo que é perturbada, esconde-se na porção mais distante do seu abrigo.

Nem sempre uma planta supre a lagarta com alimento durante toda a fase larval. Em culturas cujo plantio foi feito em linhas, ou nas plantações em cóvas, até quatro plantas de arroz foram sacrificadas por uma lagarta.

Tambem a distribuição do ataque nas culturas nem sempre é uniforme. Campos houve em que, devido ao ataque muito intenso, foram devastadas completamente as plantações. Noutras culturas, e isso é o mais comum, o ataque localiza-se em certas areas, determinando grandes falhas no conjunto da cultura. Aparentemente, em sólo mais arenoso o gráo de ataque foi mais intenso do que em sólos mais compactos.

As plantas mais desenvolvidas são muito raramente atacadas.

Inicialmente alguns lavradores confundiam os danos causados por *E. lignosellus* com o dos cupins. Este, subterraneos e tambem muito frequentes nessa região, principalmente em terrenos previamente adubados com palha do arroz beneficiado e parcialmente decomposta, prejudicam as raizes. As atacadas pelos cupins arrancam-se facilmente, notando-se lógo a falta das raizes. Quando se trata de *lignosellus,* geralmente a haste se rompe e nela se observam os estragos da lagarta, além do excremento ou, ás vêses, a propria teia do seu esconderijo.

## CONSIDERAÇÕES SOBRE A RELAÇÃO DO ATAQUE COM AS ÉPOCAS DO PLANTIO

Devido aos habitos dessa praga, não se conhecem processos dirétos e eficientes para combate-la. Os metodos aconselhados e de melhores resultados consistem em aração após a colheita, manutensão dos campos isentos de gramineas ou leguminosas, não sómente dentro da área cultivada, mas tambem nas redondezas, e tambem a rotação de cultura.

Verificou-se entretanto, em Ituverava, numa cultura de arroz, cujo plantio se processara em épocas diversas, com um intervalo aproximado de 10 dias, e em talhões adjacentes, de terreno praticamente uniforme, que o ataque ás plantas variou conforme as datas da plantação.

Num talhão de cerca de 2,5 Ha., em que o plantio fôra feito nos primeiros dias de Outubro, os danos, si bem que pronunciados, não foram tão prejudiciais como num segundo, de área aproximadamente dupla, cuja semeadura se fizera em 10 de Outubro. Em 30 de Novembro este arrozal estava completamente destruido. Um terceiro talhão, de 3 Ha., plantado em meiados do mês de Outubro, apresentava estragos menores que o do primeiro plantio desse mês. Finalmente pequenas áreas, de plantio posterior a esse ultimo, mostravam-se praticamente isentas de ataque.

Em excursões feitas a outras culturas pôde-se verificar que o prejuizo manteve a mesma relação com o plantio, e que a destruição dos arrozais atingia o ponto culminante nas plantações feitas na primeira decada do mês de Outubro, diminuindo á medida que eram retardados.

Acresce ainda a circunstancia de que os lavradores, quando a totalidade ou manchas da cultura são destruidas, fazem novo plantio no mesmo terreno.

Naturalmente, em vista das condições em que são cultivados geralmente os arrozais dessa região, o plantio deverá estar relacionado com as chuvas, não sendo possivel nem antecede-lo, nem retarda-lo de muito.

Mas a observação preliminar da relação existente entre o ataque e a época do plantio, e tambem o fáto dos orizicultores fazerem novo plantio quando a cultura foi dizimada, mostram a possibilidade de serem retardadas as plantações pelo menos até meados de Outubro, sinão mais, sem trazer consequencias muito prejudiciais á colheita.

## NOTES ON "ELASMOPALPUS LIGNOSELLUS ZELLER" (LEP. PYR.)

### A SERIOUS PEST OF CEREAL CROPS IN THE STATE OF S. PAULO


### *Abstract*

*During the past season a serious outbreak of the lesser cornstalk borer, Elasmopalpus lignosellus* ZELLER *caused severe losses in dry-land rice plantations in the northeastern portion of the State of S. Paulo, Brazil. The attack of this widely distributed pyralid is limited principally to members of the grass family and legumes in this country. Notes on the habits and importance of the species are presented together with considerations regarding the time of planting and its relation to the amount of injury caused.*


## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 30

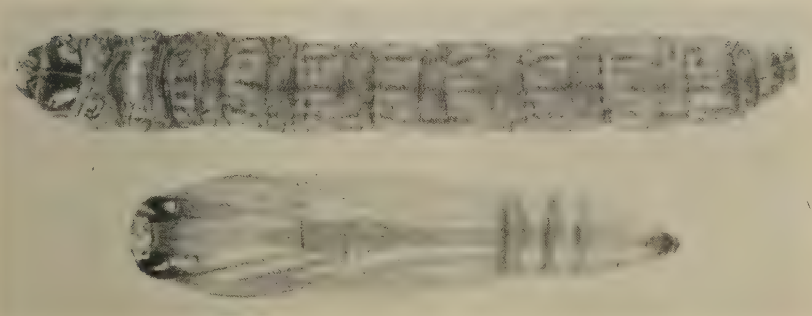
Fig. *A* — Lagarta completamente desenvolvida e crisalida de *E. lignosellus* Zeller. Aproximadamente 8 X (Autor fot.)

Fig. *B* — Plantas novas de arroz atacadas por *E. lignosellus* Zeller: *a* — abertura da galeria; *b* — abrigo preso ao orifício da galeria; *c* — casulos. Pouco aumentada. (Autor fot.)

### Estampa 31

Fig. *C* — Trecho de um arrozal muito atacado pelas lagartas de *E. lignosellus* Zeller. (Autor fot.)

Fig. *D* — Pé de milho novo mostrando o prejuizo; o estrago nas folhas é consequencia da alimentação da lagarta na galeria quando a planta era mais nova. Tamanho natural. (E. J. Hambleton fot.)



*A*




*B*



C



D

Vol. 10 — Art. 13 Dezembro de 1939

# EXPERIENCIAS PARA COMBATER O PERCEVEJO "HORCIUS NOBILELLUS (BERG)" DO ALGODÃO

POR

E. J. Hambleton

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 2 figuras no texto

Em 1938 o percevejo do algodoeiro, *Horcius nobilellus* (BERG) foi constatado causando prejuizos á cultura no municipio de Ribeirão Preto. As observações preliminares sobre o inséto foram publicadas pelo autor (4), mas nenhuma consideração foi feita quanto ao combate. Na presente estação (1939) foram conduzidas na Fazenda Dumont, no mesmo municipio, uma série de experiencias com o fim de estudar: 1.º a influencia de diversos inseticidas sobre as ninfas e adultos de *H. nobilellus,* como um possivel meio de controla-los por meio de polvilhamentos, 2.º a determinação da época e frequencia das aplicações e 3.º a relação dos tratamentos com a colheita.

Diversos entomologistas, especialmente EWING e MCGARR (2) nos ultimos cinco ou seis anos conseguiram excelentes resultados com as misturas de enxofre e arseniatos, no combate a *Psallus seriatus* REUT., aplicadas nos algodoais do Estado de Texas (Estados Unidos da America do Norte). Os mesmos autores (1) obtiveram tambem bons resultados contra essa praga com a mistura de arseniato de calcio e verde-paris. Como base para as investigações contra o percevejo *Horcius nobilellus,* foram escolhidos inseticidas semelhantes, para serem empregados nas áreas destinadas ás experiencias, em S. Paulo. Nessas experiencias foi usada uma especie de enxofre ventilado, capás de passar 96 % numa tela de 200-«mesh» nas seguintes misturas: enxofre e verde-paris, na proporção de 90 partes para 10; enxofre, arseniato de chumbo e sulfato de nicotina na proporção de 87:10:3; arseniato de calcio e verde-paris na proporção de 80 partes para 20, e finalmente uma mistura de arseniato de aluminio e verde-paris na proporção de 80 partes para 20. Todo esse material foi fornecido e preparado especialmente por uma companhia comercial de inseticidas.

## USO DO AGRUPAMENTO DAS AREAS PELO METODO DO QUADRADO LATINO, NAS EXPERIENCIAS

GAINES (3) demonstrou que o arranjo em quadrado latino é um metodo muito seguro de experimentação e póde ser usado com exito na comparação do efeito de varios inseticidas sobre os insétos do algo-

dão. Em 19 de Janeiro localizou-se numa cultura uniforme de algodão, um quadrado latino constituido de 36 parcelas. Essa cultura tinha sido plantada aproximadamente na segunda semana de Outubro e as plantas mediam entre 80 e 90 cms. de altura. Dentro do quadrado as parcelas foram dispostas de tal modo que cada um dos seis tratamentos verificou-se uma vez em cada fileira e uma vez em cada coluna executaram-se seis repetições por experimento. Conforme se vê na fig. 1, cada parcela tinha a largura correspondente a 10 fileiras de algodão e 19,36 ms. de comprimento, equivalendo cada uma a 1/100 do alqueire paulista. Uma rua de 2,50 ms., correspondente a 2 fileiras de algodão, foi o espaçamento deixado nos lados e extremidades de cada parcela. Como testemunhas deixaram-se seis parcelas sem nenhuma especie de tratamento.

### APLICAÇÕES DO INSETICIDA

As aplicações do inseticida em pó foram feitas de manhã cêdo com uma polvilhadeira manual de uma fileira. As parcelas, marcadas com estacas grandes e cada uma com a etiqueta conveniente, eram facilmente distinguiveis no decurso dos trabalhos; recebendo todas o mesmo tratamento, foram tratadas consecutivamente. Depois de cada aplicação nas seis parcelas, as polvilhadeiras eram esvaziadas e enchidas com a outra mistura, e nova aplicação se repetia de modo identico por mais seis parcelas. O trabalho, executado por dois homens, continuava sem interrupção, até que o conjunto de todas as parcelas fosse concluído.

Cinco polvilhamentos foram feitos, cada um com o intervalo de uma semana, a partir de 4 de Fevereiro até o dia 3 de Março. As quantidades médias de pó usadas por alqueire foram as seguintes: mistura de enxofre, arseniato de chumbo e sulfato de nicotina, 44,79 quilos; mistura de enxofre e verde-paris, 48,24 quilos; enxofre, 47,64 quilos; mistura de arseniato de calcio e verde-paris, 26,73 quilos; mistura de arseniato de aluminio e verde-paris, 16,76 quilos. Alem desses tratamentos contra o *H. nobilellus* foram feitas tambem, em todas as parcelas, as pulverizações de arseniato de chumbo para combater a *Alabama argillacea*. Durante a primeira semana de Março a infestação pelo pulgão *Aphis gossypii* aumentou rapidamente, notadamente nas parcelas tratadas com as misturas em que entravam os arseniatos de calcio e aluminio. A perda das folhas nessas parcelas foi muito evidente.

Em todas as aplicações com as misturas de arseniato de calcio, excéto uma, foram usadas quantidades excessivas da mistura devido á dificuldade de regular a polvilhadeira, resultando uma consideravel queima da folhagem. O prejuizo pelos afideos e a queima provocada pelo arseniato alteraram a produção dessas parcelas.

### DETERMINAÇÃO DA INFESTAÇÃO

Desde que a maior parte da alimentação de *H. nobilellus* se processa sobre os botões florais, todas as determinações da infestação foram baseadas nas contagens de ninfas e adultos vivos encontrados em 150 botões existentes nas plantas que constituiam as quatro ruas centrais de cada parcela. Para essa determinação foram escolhidos os

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| C | E | A | F | B | D |
| A | D | C | E | F | B |
| E | B | F | A | D | C |
| B | C | E | D | A | F |
| D | F | B | C | E | A |
| F | A | D | B | C | E |

Fig. 1 — Disposição das parcelas do quadrado latino nas experiencias de inseticidas para combater o percevejo. A, enxofre e verde-paris (90:10); B, enxofre, arseniato de chumbo e sulfato de nicotina (87:10:3); C, enxofre (200-"mesh"); D, arseniato de calcio e verde-paris (80:20); E, arseniato de aluminio e verde-paris (80:20); F, testemunho.

botões de tamanho médio, em vista da preferencia que as ninfas por eles manifestam. Fizeram-se seis contagens: a 1.ª no dia 3 de Fevereiro, precedendo a primeira aplicação dos inseticidas no dia 4 do mesmo mês; as determinações sucessivas, feitas com o intervalo sema-

nal até o dia 9 de Março, precederam sempre o dia do polvilhamento. Quando se fez a primeira inspeção na Fazenda Dumont, no dia 5 de Janeiro, tanto os adultos como as ninfas do percevejo eram muito escassos. Os algodoeiros mediam nessa época cerca de 60 cms. de altura e a quantidade de botões florais era minima. O exame de 500 brótos terminais avulsamente observados numa área de um alqueire de cultura, deu a média de 2,4 individuos por 100 brótos examinados. Os adultos eram mais numerosos do que as ninfas, guardando a proporção de 2 para 1. A atividade do inséto e o desenvolvimento dos botões au-

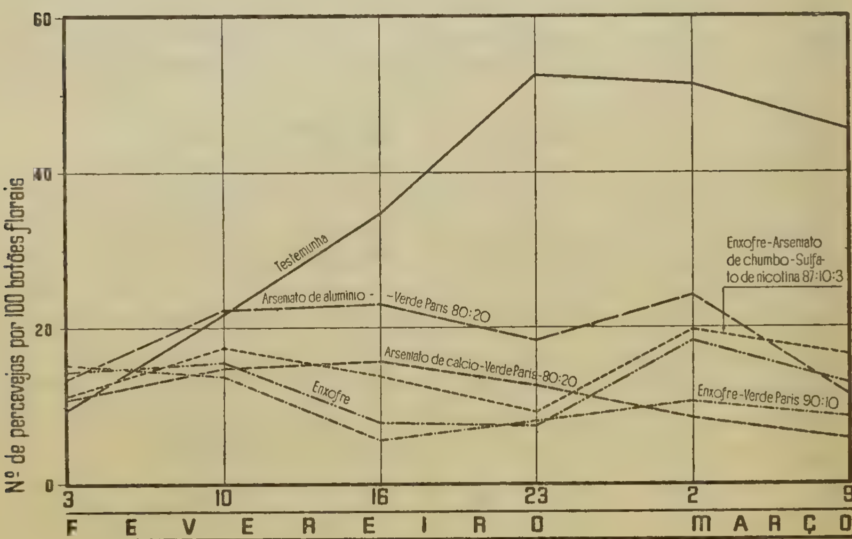



Fig. 2 — Resumo das determinações de infestação do percevejo *H. nobilellus* nas parcelas do quadrado latino em Ribeirão Preto, S. Paulo, 1939, mostrando o controle conseguido pelos diversos tratamentos.

mentaram gradativamente daí em diante. No inicio das experiencias o numero de adultos e ninfas para cada centena de botões florais era em média de 5,33 a 20,6, em todas as parcelas, sendo a relação entre ninfas e adultos, de 5 para 1. Na fig. 2 mostra-se o resumo da determinação da infestação feita no quadrado latino em 1939.

Conquanto se assegurasse o controle do inseto com todos os inseticidas experimentados, houve entre eles manifesta diferença. Depois que os polvilhamentos começaram a média de infestação nas parcelas tratadas com a mistura de enxofre e verde-paris foi a mais baixa. Em seguida as misturas de arseniato de calcio e enxofre sómente mostraram resul-

tados pouco diferentes. O efeito da mistura de arseniato de aluminio e verde-paris foi aproximadamente a metade do da mistura com arseniato de calcio, apesar de conter tambem 42 % de $As_2O_5$. A infestação média dos lotes não tratados aumentou rapidamente até 23 de Fevereiro, dia em que o maximo de 52,44 ninfas e adultos do percevejo foi encontrado em 100 botões. Nesse mesmo dia, nas parcelas tratadas registrou-se a maior infestação. Uma semana mais tarde os lotes não tratados mostravam uma leve diminuição no numero de percevejos, enquanto em todos os tratados, excéto as parcelas polvilhadas com a mistura de arseniato de calcio, houvera um notavel aumento. Nenhuma razão pode ser apresentada para explicar esse aumento de infestação, salvo si ele coincidiu com o periodo de «shedding» intenso, conforme se discute mais adiante, havendo por isso menor quantidade de botões e maçãs sobre os quais pudessem alimentar-se.

### EFEITOS DAS CONDIÇÕES CLIMATICAS E O "SHEDDING"

As condições do tempo durante o periodo dos polvilhamentos foram favoraveis em todas as aplicações feitas, excéto na primeira, que teve a sua eficiencia restrita sómente ás poucas horas que antecederam á chuva. Durante esse periodo a quéda pluviometrica total foi de 209,1 mms. Mais da metade dessa queda, ou sejam 154,9 mms., verificou-se entre o terceiro e decimo dias de Fevereiro. Logo depois desses dias seguiu-se uma estiagem de oito dias, no decurso da qual as altas temperaturas verificadas diariamente exerceram uma influencia perniciosa sobre os algodoeiros. Esse efeito foi manifestado atravez o intenso «shedding» das maçãs pequenas em todos os talhões da experiencia, bem como em outros campos, num raio de varios quilometros. O «shedding» continuou mesmo durante o periodo em que foi conseguido o maximo de controle do percevejo nas parcelas tratadas, reduzindo a colheita e restringindo o lucro que poderia ter sido obtido, dados os resultados fornecidos pelos polvilhamentos.

Em Ribeirão Preto e vizinhanças, em outros anos, a deficiencia de chuvas em Fevereiro e Março (os mêses criticos da frutificação dos algodoais), deve ter sido, sem duvida, a causa das baixas colheitas. Durante os mêses de Janeiro, Fevereiro e Março do corrente ano, a quéda total das chuvas foi sómente 61 mms., inferior á média de 642 mms. obtida nos dez ultimos anos. A distribuição desigual de chuvas e as altas temperaturas diarias durante os periodos em que elas escasseiam parecem constituir os principais fatores do importante problema do «shedding».

COLHEITA DO ALGODÃO

Os calculos da produção foram obtidos mediante cuidadosa pesagem do algodão colhido em cada parcela. Foram feitas tres colheitas: a primeira no dia 16 de Março, a segunda em 21 de Abril e a terceira em 16 de Junho. As colheitas provenientes das parcelas que receberam o mesmo tratamento foram somadas entre si e a produção total foi calculada na base de um alqueire paulista, calculando-se do mesmo modo a colheita das seis parcelas não tratadas. Na tabela 1 mostram-se as médias de infestação pelo percevejo, as quantidades dos inseticidas usados, porcentagem de mortandade, colheita do algodão e o aumento da produção, nas diferentes experiencias do quadrado latino em relação ás parcelas não tratadas. A colheita total de todos os talhões das experiencias foi 1.508,6 quilos, equivalentes a 279,16 arrobas por alqueire. Essa produção foi aproximadamente 150 arrobas superior á média de produção no Estado de S. Paulo. A colheita das parcelas testemunhas foi, em média, 275,7 arrobas por alqueire. Apesar de obter-se a maior porcentagem de mortandade do percevejo com a mistura de enxofre e verde-paris, nas parcelas polvilhadas com enxofre sómente se conseguiram 18,9 arrobas a mais. Poder-se-á notar que a diferença na produção entre as parcelas tratadas com enxofre, misturas de enxofre e verde-paris e enxofre e nicotina, não foi muito significativa. Nas parcelas tratadas com as misturas de arseniato de calcio a média da produção foi de 251,7 e 271,9 arrobas respectivamente, sendo inferiores á colheita das parcelas testemunhas.

Essas duas misturas determinaram um fraco controle do percevejo, não proporcionando bons resultados sob as condições em que foram experimentadas.

Reduzindo-se a quantidade da mistura de arseniato de calcio em pó, talvez obtivessemos um melhor resultado, de qualquer maneira, porém, nem ésta, nem a de arseniato de aluminio podem ser consideradas muito satisfatorias quando aplicadas nos algodoais de S. Paulo, em vista da influencia que exercem sobre os afideos, incrementando o seu desenvolvimento quando estão presentes.

EXPERIMENTAÇÕES EM PARCELAS MAIORES PARA CONFRONTAR ENXOFRE COM OS OUTROS INSETICIDAS

Estas experiencias consistiram de quatro talhões separados, compostos cada um de tres parcelas, cada qual da largura correspondente a doze fileiras de algodão por 50,4 ms. de comprimento, ou 1/32 de um alqueire paulista. Separando cada parcela, deixou-se uma faixa de 2,50 ms. nas extremidades e nos lados, respectivamente. As parcelas extremas de cada área foram polvilhadas contra o percevejo, deixando-

TABELA 1

Resumo das experiencias de combate ao *Horcius nobilellus* no quadrado latino, mostrando as quantidades de inseticida usado, as medias de infestação, a porcentagem de mortandade, a produção e o aumento de produção em relação á testemunha, Ribeirão Preto, 1939

| Experiencia | Material usado | Aplicações de inseticida, media por alqueire (*) | | Numero medio de percevejos por 100 botões florais | | Porcentagem de mortandade (**) | Produção de algodão em rama, media em arrobas (***) por alqueire | Aumento da produção em relação á testemunha em arrobas por alqueire |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N.º | Quilos por aplicação | Antes do inicio do polvilhamento | Depois do inicio do polvilhamento | | | |
| A | Enxofre 87 %, Arseniato de chumbo 10 %, Sulfato de nicotina 3 %. . | 5 | 44,79 | 10,33 | 15,23 | 57,63 | 291,3 | 15,6 |
| B | Enxofre 90 %, Verde-paris 10 %. . | 5 | 48,24 | 14,44 | 9,10 | 72,99 | 290,0 | 14,3 |
| C | Enxofre . . . . . . . . . . . . | 5 | 47,64 | 14,33 | 12,30 | 64,10 | 294,6 | 18,9 |
| D | Arseniato de calcio 80 %, Verde-paris 20 %. . . . . . . . . . | 5 | 26,73 | 11,71 | 11,52 | 66,80 | 251,7 | — 23,9 |
| E | Arseniato de aluminio 80 %, Verde-paris 20 %. . . . . . . . | 5 | 16,76 | 12,77 | 19,61 | 56,09 | 271,9 | — 3,7 |
| F | Testemunha. . . . . . . . . . . | — | — | 9,55 | 41,02 | — | 275,7 | — |

(*) Um alqueire paulista representa 24.200 metros quadrados.

(**) A porcentagem de mortandade constatada aqui foi computada usando-se a formula $\frac{(X - Y)\ 100}{X}$, sendo X o numero medio de percevejos vivos encontrados nas testemunhas durante o periodo de tratamento, e Y a porcentagem de percevejos vivos encontrados sobre as parcelas polvilhadas durante o mesmo periodo.

(***) Uma arroba equivale a 15 Quilos.

se a do centro como testemunha. Todos os talhões foram escolhidos num campo de cultura uniforme, ainda pequena. Planejou-se a experiencia de forma a fazer-se num talhão o confronto do enxofre com a mistura de enxofre e verde-paris e com a testemunha não tratada; no segundo o confronto do enxofre com a mistura de sulfato de nicotina e arseniato de chumbo e com a testemunha; no terceiro o confronto do enxofre com a mistura de arseniato de calcio e verde-paris e com a testemunha; e finalmente no quarto o confronto do enxofre (200-«mesh») com o enxofre (325-«mesh») (*) e com a testemunha.

TABELA 2

Confronto dos efeitos do enxofre com os outros inseticidas usados no combate ao *Horcius nobilellus*, em parcelas de 1/32 do alqueire, Ribeirão Preto, 1939

| | Tratamento | Aplicações de inseticida, media por alqueire (**) | | Numero medio de percevejos por 100 botões floraes | | Produção de algodão em rama, numero medio de arrobas (***) por alqueire | Aumento de produção em relação ás testemunhas, em arrobas por alqueire |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | N.o | Quilos por aplicação | Antes do polvilhamento | Depois de iniciar o polvilhamento | | |
| 1 | A-Enxofre . . . . . | 5 | 44,7 | 14,0 | 16,3 | 261,2 | 43,4 |
| | B-Enxofre 80 %, Verde-paris 20 %. . . | 5 | 46,8 | 6,0 | 7,0 | 297,4 | 79,6 |
| | C-Testemunha . . . | — | — | 12,0 | 39,3 | 217,8 | — |
| 2 | A-Enxofre . . . . . | 5 | 44,3 | 15,5 | 12,3 | 281,6 | 24,0 |
| | B-Enxofre 80%, Arseniato de chumbo 10 %, Sulfato de nicot. 3 % | 5 | 37,8 | 17,0 | 19,7 | 252,3 | — 5,3 |
| | C-Testemunha. . . . | — | — | 13,0 | 44,7 | 257,6 | — |
| 3 | A-Enxofre . . . . . | 5 | 44,7 | 14,0 | 18,5 | 312,7 | 41,0 |
| | B-Arseniato de calcio 80%, Verde-paris 20% | 5 | 20,4 | 15,5 | 11,0 | 267,4 | — 4,3 |
| | C-Testemunha. . . . | — | — | 12,5 | 49,8 | 271,7 | — |
| 4 | A-Enxofre (200-«mesh») | 5 | 46,1 | 10,0 | 9,2 | 257,5 | 2,5 |
| | B-Enxofre (325-«mesh») | 5 | 38,4 | 15,5 | 10,4 | 305,6 | 50,6 |
| | C-Testemunha. . . . | — | — | 15,5 | 40,0 | 255,0 | — |

(**) Um alqueire equivale a 24.200 ms. quadrados. (***) Uma arroba equivale a 15 Quilos.

Foram feitos cinco polvilhamentos do mesmo modo e nas mesmas datas já mencionadas para as experiencias do quadrado latino. As determinações das infestações, realizadas nos dias que precederam os polvilhamentos foram feitas contando-se numero de ninfas do percevejo e adultos encontrados sobre os 200 botões florais de tamanho médio, examinados nas 4.ª, 5.ª, 8.ª e 9.ª fileiras de cada parcela. A

(*) Produto importado e fornecido por Dr. Blem & Cia. Ltda., com a garantia de que 98% passaria a tela de 325-«mesh».

tabela 2 mostra a média das infestações, quantidade do inseticida em pó aplicado, colheita e aumento desta em relação ás parcelas testemunhas, das diferentes parcelas.

E' obvio que a produção do algodão em rama produzido em algumas das parcelas não está de acordo com o controle do percevejo obtido nos diferentes talhões. Conforme pode ser visto nas parcelas 2B, 3B e 4A., todas parcelas tratadas com enxofre, excéto a 4A mostraram um rendimento favoravel. A produção reduzida das parcelas 4A e 2B, polvilhadas com a mistura de enxofre e sulfato de nicotina, póde, até certo ponto, ser explicada, pois a própria condição das plantas foi a causa da colheita inferior, nas referidas parcelas. A parcela tratada com a mistura de arseniato de calcio e verde-paris (3B) produziu tanto quanto a testemunha.

## EXPERIENCIAS COM O FIM DE DETERMINAR A EPOCA E NUMERO DE APLICAÇÕES DOS INSETICIDAS

Uma série de sete parcelas seguidas, medindo 1/32 de um alqueire paulista, separadas entre si por uma rua de 2,50 ms. de largura e denominadas A, B, C, D, E, F e G, respectivamente, foi usada para este trabalho. Destinou-se a parcela G para testemunha.

TABELA 3

Efeito da epoca do polvilhamento e numero de aplicações do enxofre em pó na produção do algodão em rama nas experiencias de combate ao *Horcius nobilellus*, Ribeirão Preto, 1939.

| Experiencia | Data da 1.ª aplicação de enxofre | Aplicações de inseticida, media por alqueire (*) | | Produção de algodão em rama, arrobas (**) por alqueire | Aumento da produção em arrobas por alqueire em relação á testemunha |
|---|---|---|---|---|---|
| | | N.º | Quilos por aplicação | | |
| A | Janeiro 26 | 6 | 45,4 | 353,9 | 91,8 |
| B | Fevereiro 4 | 5 | 49,8 | 332,5 | 70,4 |
| C | Fevereiro 11 | 4 | 45,4 | 340,2 | 78,4 |
| D | Fevereiro 17 | 3 | 45,7 | 288,4 | 26,3 |
| E | Fevereiro 24 | 2 | 47,2 | 255,2 | – 6,9 |
| F | Março 3 | 1 | 48,5 | 269,3 | 7,2 |
| G Testemunha | — | — | — | 262,1 | — |

(*) Um alqueire paulista representa 24.000 ms.$^2$ (**) Uma arroba representa 15 quilos.

O polvilhamento, empregando-se o enxofre 200-«mesh», começou no dia 26 de Janeiro na parcela A e prosseguiu, com intervalos semanais, até que fosse efetuado o total de seis aplicações do inseticida. Uma semana depois de ter principiado o tratamento na parcela A, foi feito em B o 1.º polvilhamento. O primeiro tratamento em cada uma

das parcelas subsequentes foi realizado de maneira identica, isto é, uma semana depois do tratamento inicial da parcela precedente.

Uma vez feita a aplicação inicial, o polvilhamento prosseguiu, com intervalos semanais até o dia 3 de Março. Na tabela 3 apresenta-se um resumo dos dados obtidos nessas experiencias. Os resultados indicam que onde se efetuaram tres ou quatro tratamentos com enxofre sómente, de fins de Janeiro a meiados de Fevereiro, conseguiu-se um bom controle do percevejo *H. nobilellus,* com um aumento de produção de 70 a 91 arrobas por alqueire, sobre as testemunhas.

Onde o polvilhamento se prolongou até além de meiados de Fevereiro, periodo em que a população do percevejo atingira o maximo, muito pouco ou nenhum beneficio se usufruiu dos tratamentos, em vista de já se ter verificado em épocas anteriores a maioria dos prejuizos aos algodoais.

## SUMARIO

Uma experiencia de combate ao percevejo *Horcius nobilellus* foi realizada em 36 parcelas pequenas (sendo cada uma 1/32 do alqueire paulista) dispostas em quadrado latino afim de comparar os efeitos do enxofre, das misturas de enxofre e verde-paris (90:10), enxofre, arseniato de chumbo e sulfato de nicotina (87:10:3), arseniato de calcio e verde-paris (80:20) e arseniato de aluminio e verde-paris (80:20).

As determinações das infestações mostraram que o contrôle foi obtido com todas as modalidades das misturas usadas, assim como com o enxofre sómente. A média de rendimento maior, ou sejam 18,9 arrobas de algodão em rama por alqueire, foi conseguida nas parcelas polvilhadas com enxofre, na proporção de 43,3 a 54,4 quilos por alqueire, sendo ligeiramente inferior a produção obtida nas parcelas tratadas com as duas misturas de enxofre. As parcelas tratadas com as misturas de arseniato de calcio-verde-paris e arseniato de aluminio-verde-paris não chegaram a produzir o mesmo que as parcelas testemunhas.

Os efeitos do enxofre e misturas contra o percevejo foram tambem demonstrados numa série de parcelas maiores. Os resultados mostraram porém pouca correlação entre a infestação e colheita obtida. Todas as parcelas polvilhadas com enxofre, excéto uma, produziram um rendimento maior em relação ás testemunhas, enquanto a mistura de enxofre e verde-paris aplicada na proporção de 47 a 54,2 quilos por alqueire provou ser superior a todos os outros inseticidas usados, proporcionando um rendimento de 79,6 arrobas de algodão em rama por alqueire.

Tres ou quatro polvilhamentos com enxofre sómente, aplicados na proporção de 45,4 a 49,8 quilos por alqueire, resultaram num aumento de produção de 70 a 91 arrobas por alqueire.

A colheita foi sensivelmente alterada em certas parcelas devido á grande infestação de pulgões, queima pela mistura de arseniato de calcio e verde-paris, e tambem, em todos os lotes, por causa do «shedding». A distribuição desigual de chuvas, acompanhada de temperaturas elevadas, diariamente, durante o periodo critico da frutificação, foram os fatores considerados responsaveis pelo «shedding» verificado nessa estação.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja externar seus agradecimentos ao Sr. J. Sherrington, diretor presidente da Companhia Agricola Fazenda Dumont pelo seu interesse e esplendida cooperação, tornando possivel a realização dessas investigações; ao Dr. G. M. Layola, gerente da Elekeiros S/A, que amavelmente atendeu ao nosso pedido, preparando e fornecendo os inseticidas empregados nesses estudos, e ao Dr. H. F. G. Sauer, que nos ajudou nas experiencias no campo.

## EXPERIMENTS FOR THE CONTROL OF THE PLANT-BUG "HORCIUS NOBILELLUS (BERG)" ON COTTON

### *Abstract*

*Field experiments during 1939 were conducted (1) to compare the effects of several insecticides on the nymphs and adults of the plant-bug Horcius nobilellus as a possible means of controlling the insect with poison dusts, (2) to determine the time and frequency of dust applications, and (3) their influence on the cotton crop. Infestation records secured from 36 small plots arranged in a Latin square indicate that a mixture of 90 % sulfur and Paris green applied as a dust at the rate of 44.3 to 56.5 kilos per «alqueire» was the most effective insecticide, although the blocks dusted with a 200-mesh sulfur produced the highest average yield.*

*The infestation records obtained, and especially those of the larger field plots, show a rather poor correlation between actual control and the increase in yields over the untreated checks. The block dusted with the sulfur-Paris green mixture at the rate of 47 to 54.2 kilos per «alqueire» produced a gain of 79.6 «arrobas» of seed cotton per «alqueire», or approximately 430 pounds per acre. Increased yields of 70 to 91 «arrobas» of seed cotton per «alqueire» resulted where three or four sulfur-dust applications were made at the rate of 45.4 to 49.8 kilos per «alqueire».*

*Various factors contributed to a reduction in yields throughout the experimental plots. The most detrimental of these was shedding of small immature bolls. This phenomenon was general and its occurrence coincided with eight days of dry weather and high daily temperatures following an excessive rainy period. A severe cotton aphis infestation in the plots dusted with the calcium and aluminium arsenate mixtures together with a certain amount of burning also effected the final results.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — Ewing, K. P. and McGarr, R. L. — 1936 — Two years' field experiments on the control of the cotton flea hopper with several insecticides. *Jour. Econ. Ent.* **29**, 80-88.

2 — Ewing, K. P. and McGarr, R. L. — 1937 — Cotton flea hopper control in 1936. *Jour. Econ. Ent.*, **30**, 850-854.

3 — Gaines, J. C. — 1937 — Cotton flea hopper control tests, using the Latin square plat arrangement and analysis of variance. *Jour. Econ. Ent.*, **30**, 119-125.

4 — Hambleton, E. J. — 1938 — O percevejo «*Horcius nobilellus* (Berg)» como nova praga do algodoeiro em São Paulo; observações preliminares. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, **9**, 85-92, com figs.

—o—

Vol. 10 — Art. 14 Dezembro de 1939

# ESTUDOS SOBRE INFLAMAÇÃO (*)

## IV - EXPERIENCIAS COM EXSUDATOS INFLAMATORIOS POBRES EM HISTAMINA

POR

M. Rocha e Silva & O. Bier

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 6 figuras no texto

A participação, nos fenomenos inflamatorios, de uma substancia, de propriedades semelhantes á histamina, foi admitida por LEWIS & COLL. (1924-27), fundamentados em numerosas experiencias. Posteriormente, KROGH (1929) admitiu a participação, em tais fenomenos, pelo menos de duas substancias: uma substancia-H facilmente difusivel, provavelmente a propria histamina, e uma substancia macromolecular, o colloide-H, cuja existencia explicaria a lenta difusão do eritema produzido pelos raios ultra-violeta. Em 1929, DALE admitiu que tais substancias poderiam ser identificadas a complexos moleculares, nos quais a histamina se encontraria em ligação mais ou menos frouxa com as proteinas tissulares.

A idéa de que a histamina fosse responsavel pelo aumento da permeabilidade capilar nas reações inflamatorias ao nivel da péle, assentava-se nas seguintes evidencias bem estabelecidas naquela época: a) a histamina tem uma ação diréta sobre os capilares, dilatando-os e aumentando-lhes a permeabilidade, o que foi demonstrado dirétamente por DALE & RICHARDS (1918); b) a histamina é capaz de reproduzir todas as sequencias do que foi designado por LEWIS & COLL. como «triplice reação» aos mais diversos irritantes; c) a histamina se encontra na péle dos animais e do homem em dóses suficientemente elevadas para, no caso de ser libertada por um agente deleterio, explicar a reação produzida por este.

Recentemente MITCHELL (1938) procurou explicar a lenta difusão do eritema produzido pela irradiação ultra-violeta fazendo reviver de certo modo a primitiva concepção de KROGH, da existencia de uma substancia macromolecular (colloide-H) de propriedades semelhantes ás da histamina. Tendo verificado a existencia de um desdobramento de proteinas sob a ação das irradiações ultra-violeta (MITCHELL & RIDEAL, 1938), MITCHELL admitiu que as substancias responsaveis pelo eritema e pelo aumento de permeabilidade capilar, fossem proteoses capazes

(*) Os resultados obtidos até agora foram comunicados de maneira global ao 3.º Congresso Internacional de Microbiologia, reunido em Nova York de 2 a 9 de Setembro de 1939.

de produzir efeitos semelhantes aos da histamina, sobre os capilares e arteriolas. Acreditamos que uma explicação mais simples para essa lenta difusão seria admitir que tais proteoses libertam histamina dos tecidos á medida que difundem. Assim, a lenta propagação do eritema produzido pela irradiação estaria realmente ligada á lenta difusão de proteoses de alto peso molecular, mas o eritema mesmo seria ainda produzido pela histamina libertada dos tecidos por tais produtos de desdobramento das proteinas. Nessa ordem de idéas, póde ser lembrado que recentemente FELDBERG & O'CONNOR (1937) mostraram que a peptona liberta histamina do pulmão de cobaia.

Numa série numerosa de trabalhos, MENKIN (1936-39) postulou a existencia, nos exsudatos inflamatorios, de uma substancia capaz de produzir, quando injetada intradermicamente no coelho, um aumento da permeabilidade capilar e migração leucocitaria. Essa substancia, que designou como «leucotaxina», seria libertada dos tecidos sob a ação de irritantes diversos, e seria responsavel pelas sequencias basicas da inflamação (eritema, edema e migração leucocitaria). O isolamento desse fator, primeiro sob fórma purificada e depois sob fórma cristalina, foi tentado por MENKIN, baseado exclusivamente num test inespecifico: a injeção intradermica em coelhos, determinando um acumulo local, de azul tripan, injetado na veia.

Em trabalhos anteriores (1938-39) salientamos a arbitrariedade da introdução desse novo fator, e para isso nos baseámos nos seguintes fátos: a) A histamina é habitualmente encontrada nos exsudatos inflamatorios em quantidades apreciaveis; b) em concentrações apropriadas, injetada intradermicamente na péle do coelho, reproduz exátamente o test descrito por MENKIN como caráteristico da «leucotaxina»; c) frequentemente o exsudato inflamatorio produz na péle do coelho, uma reação semelhante á descrita por MENKIN como caráteristica da histamina (zona branca circundada por um halo azul).

Verificamos ainda (resultados não publicados) que o método utilizado por MENKIN para purificar o seu fator, de modo nenhum exclúe a possibilidade da histamina contaminar as diferentes frações, porquanto uma pequena quantidade de histamina adicionada ao sôro normal de cavalo, atravessa, com perdas insignificantes, todas as fases do método. E' verdade que recentemente MENKIN (1939) mostrou que o seu preparado cristalino é praticamente livre de histamina, mas todos os resultados descritos anteriormente por esse autor (1938), em que analisou a eficiencia do seu método de purificação, deverão ser rigorosamente revistos. Além disso, a verificação de que a histamina não

está presente nos seus cristais não exclue a possibilidade da participação daquela substancia na reação produzida pela «leucotaxina» na péle do coelho. Realmente é um fáto bem conhecido de todos que o conteúdo em histamina, da péle, é muito elevado (TARRAS-WAHLBERG, 1936, RIESSER, 1937, ROCHA e SILVA & BIER, 1938). Portanto o test utilizado por MENKIN não permite de fórma alguma excluir a possibilidade de pequenas quantidades de histamina, libertadas dos tecidos da péle, explicarem a dilatação e aumento de permeabilidade capilar que condicionam um test positivo com a técnica do azul tripan. Veremos mais adiante que um exsudato inflamatorio com baixo têor em histamina libertou quantidade apreciavel desta ultima, pelo simples contáto com fragmentos de pulmão de cobaia. O que provavelmente constituiu o trabalho de MENKIN, foi isolar sob fórma bastante purificada essa substancia capaz de libertar histamina quando injetada no coelho e presente nos exsudatos inflamatorios. Si uma mesma substancia, químicamente definivel, é responsavel por essa libertação de histamina e tambem pelo quimiotactismo positivo dos leucocitos, isso exigiria a comprovação química da pureza da substancia isolada por MENKIN, o que até hoje, ao que saibamos, ainda não foi feito.

As origens do método utilizado por MENKIN, bem como a sua inespecificidade, é sabida de todos:

CARDY & EVANS (1912) virificaram que um corante injetado na veia, se acumula em regiões do sístema nervoso central onde se desenvolveu um processo morbido, como amolecimento e inflamação. Os tecidos normais do sístema nervoso permanecem livres do corante.

WINTERNITZ & HIRSCHFELDER (1913) demonstraram que o azul tripan injetado na veia de animais portadores de pneumonia lobar experimental, córa eletivamente a área pulmonar lesada.

LEWIS (1916) mostrou em coelhos com uma inflamação tuberculosa da córnea, que o vermelho tripan, injetado na veia, se acumula na área congestionada.

MC CLELLAN & GOODPASTURE (1923) mostraram fenomeno semelhante, injetando azul tripan na veia, em coelhos com lesões encefalicas herpeticas.

OKUNEFF (1924) verificou que um irritante térmico favorece a passagem de corantes vitais, do sangue para a área aquecida.

RAMSDELL (1928) mostrou um acumulo de azul tripan na área cutanea injetada com o antigeno, em coelhos e cobaias, préviamente sensibilizados. A injeção de histamina conduzia á formação de uma mancha azul muito semelhante.

KUSUETZOWSKY (1935) observou que a aplicação local de irritantes, como calor e oleo de mostarda, produz um acumulo de azul tripan na área inflamada.

Em numerosas publicações, MENKIN, verificou fáto similar injetando terebintina intradermicamente, em coelhos, e mais recentemente MENKIN (1938) mostrou ainda que a injeção de tripsina, intradermicamente, no coelho, produz o mesmo acumulo do azul tripan injetado na veia.

Daí se póde deduzir a inconsistencia da caráterização de uma substancia, cuja unica propriedade fisiologica é produzir no coelho este test inespecifico.

As experiencias que se seguem foram realizadas com exsudatos inflamatorios pobres em histamina. As experiencias anteriormente descritas, em que trabalhamos com exsudatos cujo conteúdo em histamina oscilava entre 1/20.000 a 1/50.000, não permitiram a analise fina de certas propriedades do exsudato.

Nas experiencias anteriores, tinhamos verificado que extrátos obtidos pela técnica de Barsoum & Gaddum, reproduziam quantitativamente, isto é, nas mesmas diluições, na péle do coelho, a reação produzida pelo exsudato. Mostraremos adiante que isso provavelmente só se tornou aparente pelo elevado têor em histamina dos exsudatos então estudados. As diluições em que o extráto do exsudato já nenhuma reação produziam na péle do coelho, eram muito fortes, o que não permitiu evidenciar a capacidade do exsudato, de libertar histamina da péle do coelho. Ora, veremos adiante que esta capacidade do exsudato introduz uma pequena discrepancia na comparação quantitativa entre a reação produzida pelas diversas diluições do exsudato e a produzida pelas mesmas diluições do extráto obtido pela técnica de Barsoum & Gaddum.

## MÉTODOS

Os exsudatos pleurais utilizados nas experiencias aqui descritas foram obtidos por injeção de 2 cc. de terebintina na pleura de cães.

48 horas a 72 horas depois, o animal era sacrificado, o tórax aberto e o liquido pleural colhido. Ordinariamente obtinhamos, ao fim daquele tempo, grandes quantidades (de 300 cc. a 500 cc.) de um liquido opalescente, mais ou menos turvo. Depois de demorada centrifugação, o exsudato mostrava-se limpido, apresentando alguns flócos de fibrina, sobrenadando.

A dosagem da histamina contida nos exsudatos era feita com a técnica habitual, segundo Guggenheim & Löffler, sendo o ileo de cobaia utilizado para o test. A extração da histamina era feita pelo método de Barsoum & Gaddum, modificado por Code. A figura 1 ilustra a sensibilidade do método empregado. Póde-se vêr a reação do intestino a dóses diferentes de diclorhidrato de histamina.

As experiencias realizadas no coelho, com o test do azul tripan, eram feitas da seguinte maneira: um coelho, depilado na região do abdomen, 24 horas antes, recebia em injeções intradermicas 0,3 cc. das soluções a testar. Cinco minutos depois recebia por injeção na veia da orelha, 10 cc. de uma solução de azul tripan a 1 %. A leitura era feita 10, 20 a 30 minutos depois de terminada a injeção do corante. A indicação nos quadros representa um resultado global.

Em todas as experiencias aqui referidas utilizamos soluções de diclorhidrato de histamina (Schuchardt).

Nas experiencias em que procuramos verificar a libertação de histamina sob a ação do exsudato X, utilizamos a técnica descrita por Schild. Uma cobaia

de tamanho médio, era sacrificada com um golpe na nuca e cortadas as veias do pescoço. Aberto o tórax, um dos pulmões era dissecado e colocado sucessivamente em 3 beakers contendo respetivamente 10 cc. de Tyrode (1.ª agua de lavagem), 10 cc. de Tyrode (2.ª agua de lavagem) e 10 cc. de exsudato. O todo era mantido em termostato a 39°. Depois de permanecer 20 minutos em cada uma das soluções de Tyrode, o pulmão era transferido para o beaker contendo o exsudato. Finalmente este ultimo era extraído com a técnica de CODE, e o extráto, comparado com o extráto do exsudato em natureza, era testado sobre ileo de cobaia (Fig. 6).

## RESULTADOS

Exsudato pleural do cão n.º VII: A figura 2 mostra o grafico da dosagem da histamina no exsudato. Póde-se vêr que o conteúdo em histamina é aproximadamente o de uma solução de diclorhidrato de histamina 1/17 milhões.



**Fig. 1 — Ileo de cobaia. Reação a doses variadas de diclorhidrato de histamina. (H = diclorhidrato histamina 1/1 milhão).**

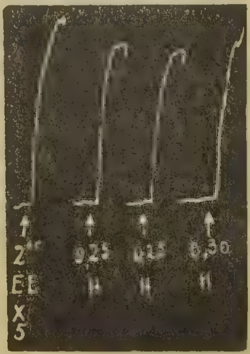


**Fig. 2 — Dosagem da histamina no exsudato do cão n.º VII. EE = extráto do exsudato (técnica Code). H = diclorhidrato histamina 1/500.000. EE × 5 = extráto do exsudato concentrado 5 vezes.**

Esse mesmo exsudato, bem como o seu extráto, obtido pela técnica de CODE, foram testados em coelho, com a técnica do azul tripan. As tabelas 1 e 2 mostram os resultados obtidos. Póde-se vêr uma discrepancia entre o conteúdo histaminico do exsudato e a reação produzida na péle pela histamina e pelo exsudato, reagindo este ultimo como uma solução de histamina 1/250.000, ao passo que a dosagem da histamina, revelada com a técnica de GUGGENHEIM & LÖFFLER, mostra um equivalente histaminico 1/17.000.000.

TABELA 1

Protocolo do coelho n.º 1517 — Exsudato do cão n.º VII

| Injetado intradermicamente com 0,3 cc. | Injetado intravenosamente com 10 cc. de azul tripan a 1 % |
|---|---|
| I. Extráto (Code). Concent. 5 vezes . | ++ |
| II. Mesmo extráto em natureza . . | — |
| III. Exsudato em natureza . . . . . | +++ |
| IV. Histamina 1/750.000. . . . . . | +++ |
| V. Histamina 1/250.000. . . . . . | +++ |
| VI. Histamina 1/ 50.000. . . . . . | ++ (Area central branca de edema). |

TABELA 2

Protocolo do coelho n.º 1518 — Exsudato do cão n.º VII

| Injetado intradermicamente com 0,3 cc. | Injetado intravenosamente com 10 cc. de azul tripan a 1 % |
|---|---|
| I. Exsudato em natureza . . . . . | +++ |
| II. Histamina 1/10.000.000 . . . . | + |
| III. Histamina 1/750.000 . . . . . | ++ |
| IV. Histamina 1/250.000 . . . . . | +++ |

Exsudato pleural do cão n.º VIII: Depois da injeção de terebintina, o cão n.º VIII foi deixado 48 horas, depois das quais foi sacrificado, colhendo-se 200 cc. de um exsudato hemorragico.

A figura 3 ilustra a dosagem da histamina contida no exsudato.

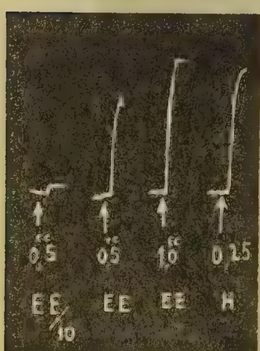



Fig. 3 — Ileo de cobaia. Dosagem da histamina contida no exsudato do cão n.º VIII. H = diclorhidrato de histamina, 1/1 milhão. EE = extráto do exsudato obtido pela técnica de Code. Conteúdo histaminico 1/4.000.000.

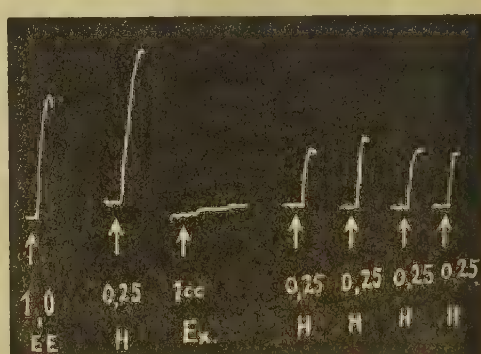



Fig. 4 — Ileo de cobaia. EE = Extráto histaminico do exsudato. Ex = Exsudato em natureza H = Diclorhidrato de histamina 1/1 milhão.

Póde-se vêr que o conteúdo histaminico do exsudato foi aproximadamente de 1/4.000.000.

A fig. 4, mostra um efeito já salientado por nós anteriormente. O efeito excitante da musculatura lisa do intestino de cobaia, produzido pelo extráto do exsudato (EE), é consideravelmente mais nitido do que o produzido pela mesma quantidade do exsudato em natureza (Ex.). Interpretamos esse fáto, admitindo que o exsudato contém substancias que antagonizam a ação da histamina sobre o intestino de cobaia, substancias essas afastadas pela técnica de extração empregada. Salientamos ainda anteriormente o fáto de que a sensibilidade do intestino de cobaia decresce consideravelmente quando se deixa em contáto este orgão com o exsudato em natureza. A figura 4, mostra esse fáto de maneira muito nitida.

A adição de 1 cc. do exsudato em natureza determina uma diminuição da intensidade da reação a 0,25 cc. de histamina.

Esse mesmo exsudato testado no coelho com a técnica do azul tripan mostrou a mesma discrepancia entre as reações produzidas pelo exsudato, e as reações produzidas por soluções puras de histamina e as mesmas diluições do extráto histaminico do exsudato (Tabelas 3 e 4).

TABELA 3

Protocolo do coelho n.º 1522 — Exsudato do cão n.º VIII

| Injetado intradermicamente com 0,3 cc. | Injetado na veia com 10 cc. de azul tripan a 1 % |
|---|---|
| I. Exsudato do cão n.º VIII, 1/10 . | + + + (ligeiro tom chocolate) |
| II. Mesmo exsudato em natureza . . | + + (Zona central hiperemica, sem acumulo de corante) |
| III. Extráto (Code) do Exsudato, 1/5 . | + ou + + |
| IV. Mesmo extráto, 1/10 . . . . . | + |
| V. Histamina 1/100.000. . . . . . | + + + (homogenea) |

TABELA 4

Protocolo do coelho n.º 1523 — Exsudato do cão n.º VIII

| Injetado intradermicamente com 0,3 cc. | Injetado na veia com 10 cc. da solução a 1 % de azul tripan |
|---|---|
| I. Exsudato 1/10 . . . . . . . . | + + + |
| II. » 1/5 . . . . . . . . | + + |
| III. » 1/1 . . . . . . . . | + + + (tom chocolate sobre toda a area corada) |
| IV. Extráto do exsudato 1/10 . . . | 0 ou + |
| V. » » » 1/5 . . . | + |
| VI. » » » 1/1 . . . | + + |
| VII. Histamina 1/5.000.000 . . . . | + + |
| VIII. Histamina 1/1.000.000 . . . . | + + + |

TABELA 5

Protocolo do coelho n.º 1525 — Exsudato do cão n.º VIII

| Injetado intradermicamente com 0,3 cc. | Injetado na veia com 10 cc. de azul tripan a 1 % |
|---|---|
| I. Exsudato VIII em natureza . . . | ++ (tom chocolate de hiperemia). |
| II. Histamina 1/500.000 . . . . . . . | ++ (Homogenea). |

Póde-se vêr (Tab. 5) que a reação produzida pelo exsudato, cujo conteúdo histaminico é de 1/4.000.000, foi mais ou menos equivalente á produzida por solução de histamina 1/500.000.

Exsudato pleural do cão n.º X: O cão n.º X recebeu 2 cc. de terebintina na pleura. 48 horas depois foi sacrificado e 450 cc. de exsudato foram colhidos na cavidade pleural.

Testado sobre ileo de cobaia, esse exsudato, extraído pela técnica de Code (Fig. 5, EE), mostrou-se praticamente inativo, nas condições da experiencia ilustrada na figura 5. Póde-se vêr ainda, na mesma

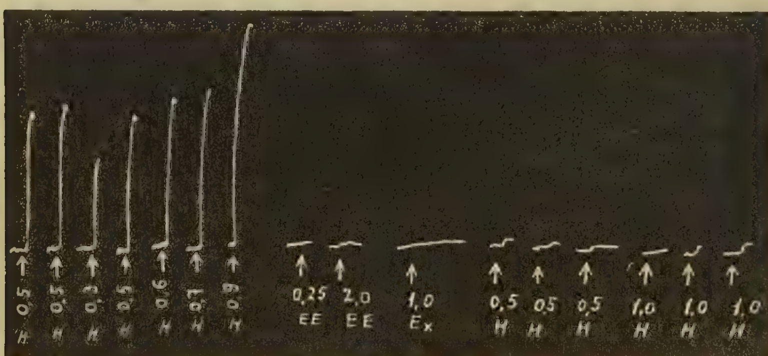



Fig. 5 — Exsudato do cão n.º X. Equivalente histaminico praticamente indosavel nas condições da experiencia. H = Diclorhidrato de histamina 1/1 milhão. EE = extráto do exsudato do cão n.º X. Ex. = Exsudato em natureza.

figura, o fáto assinalado anteriormente de que o exsudato em natureza, adicionado ao banho de Tyrode, diminúe consideravelmente e por tempo bastante longo, a sensibilidade do intestino de cobaia á histamina. Na figura 5, o intestino de cobaia, depois da adição de 1 cc. do exsudato X, deixou de reagir a doses de histamina com as quais reagia ótimamente no começo da experiencia.

Testados no coelho em injeção intradermica, o exsudato X e o seu extráto histaminico, tornaram muito patente a discrepancia a que

já nos referimos anteriormente. Embóra indosavel a quantidade de histamina, bem como nula a reação produzida pelo extráto histaminico (CODE) sobre a péle do coelho, o exsudato em natureza produzia uma reação um pouco mais forte do que a produzida por uma solução de histamina 1/500.000, sobre os capilares e arteriolas da péle do coelho (Vêr tabela 6).

TABELA 6

Protocolo do coelho n.º 1527 — Exsudato n.º X

| Injetado intradermicamente com 0,3 cc. | Injetado na veia com 10 cc. da solução de azul tripan a 1 % |
|---|---|
| I. Exsudato 1/4 . . . . . . . . | + ou ++ |
| II. » 1/2 . . . . . . . . | ++ |
| III. » 1/1 . . . . . . . . | +++ |
| IV. Extráto histaminico 1/1 . . . . | 0 |
| V. Histamina 1/500.000 . . . . . . | ++ |

L i b e r t a ç ã o d e h i s t a m i n a d o p u l m ã o d e c o b a i a p o s t o e m c o n t á t o c o m o e x s u d a t o d o c ã o n.º X: Um fragmento de pulmão de cobaia foi mantido 20 minutos em contáto com o exsudato do cão n.º X. Póde-se vêr na fig. 6, que as duas porções

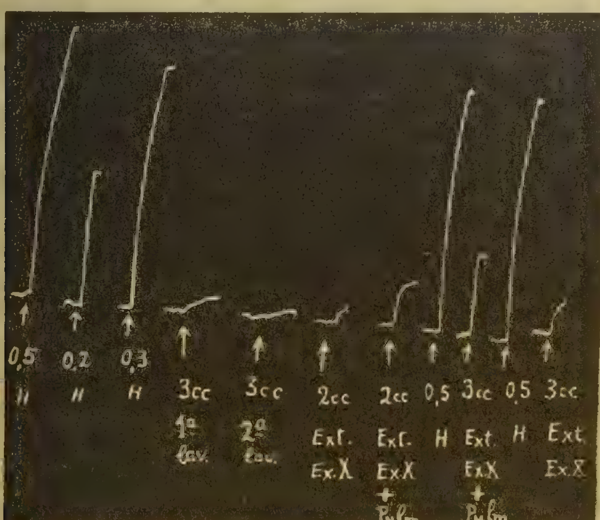



Fig. 6 — Ileo de cobaia. Ext. Ex. X = extráto do exsudato pleural do cão X. (Técnica de Code). Ext. Ex. X + Pulm. = Extráto do exsudato pleural mantido 20 minutos em contáto com o pulmão de cobaia. H = Diclorhidrato de histamina, 1/1.000.000.

de liquido de Tyrode (1.ª agua de lavagem e 2,ª agua de lavagem), mostram-se praticamente livres de histamina. Ao contrario o exsudato mantido em contáto com o mesmo pulmão de cobaia, extraído em seguida pela técnica de CODE, mostrou um conteúdo histaminico nitidamente superior ao do exsudato em natureza.

Essa capacidade do exsudato, de libertar histamina dos tecidos animais, póde perfeitamente explicar aquela discrepancia entre a reação produzida sobre a péle do coelho, pelos extrátos obtidos com a técnica de BARSOUM & GADDUM-CODE e o exsudato em natureza. Com efeito, é sabido que a péle do coelho é extremamente rica em substancias histaminicas (6 $\gamma$ a 12 $\gamma$ por grama de tecido). O fáto aqui descrito leva-nos á idéa de que o exsudato contém substancias irritantes capazes de libertarem histamina dos tecidos. O motivo pelo qual, nas nossas experiencias anteriores, esse fáto não se tornou aparente, deve provir da circunstancia de termos trabalhado com exsudatos ricos em histamina. Nesses casos havia nitida concordancia entre o efeito produzido pelas diferentes diluições do exsudato e o produzido pelas mesmas diluições do extráto histaminico. Evidentemente o efeito produzido pela histamina já contida no exsudato predominava de maneira absoluta sobre o efeito irritante do exsudato, responsavel pela libertação de histamina da péle do coelho. Com os exsudatos acima estudados, houve predominancia do efeito irritante, o que explica a discrepancia entre os efeitos produzidos pelos extrátos histaminicos e os produzidos pelo proprio exsudato.

Os resultados aqui descritos e que põem em evidencia, de maneira nitida, a presença nos exsudatos inflamatorios, de substancias que libertam histamina dos tecidos, permitirão provavelmente esclarecer os resultados descritos por MENKIN. A hipótese de que o produto purificado por MENKIN e capaz de dar a reação positiva na péle do coelho, seja uma substancia irritante do tipo da que acabamos de evidenciar nos exsudatos, parece-nos a mais simples. A hipótese formulada por MENKIN, de que o seu produto cristalino tenha uma ação diréta sobre os capilares, dilatando-os e aumentando-lhes a permeabilidade, exigiria comprovações dirétas, como as feitas por DALE & RICHARDS com a histamina.

O método utilizado por MENKIN: O que constitúe a pedra angular da argumentação de MENKIN é a pretensa incapacidade da histamina de produzir na péle do coelho o test por ele descrito como cáteristico da «leucotaxina». Segundo MENKIN, a histamina daria sempre uma reação peculiar e bastante diferente: uma área central clara, circundada por um halo azul. Em publicações anteriores

mostrámos que esse *pattern* é caráteristico da reação produzida por altas concentrações de histamina. A injeção de dóses compreendidas entre 0,25 $\gamma$ e 1 $\gamma$ produzem um acumulo uniforme de corante, muito semelhante ao produzido pelo proprio exsudato. Portanto, se a histamina é capaz de produzir um acumulo homogeneo de corante e se por outro lado a péle do coelho é um orgão extremamente rico em histamina, a concepção classica de que a histamina póde ser mobilizada por agentes irritantes os mais diversos, explicaria certamente as reações produzidas na péle do coelho pelas substancias inflamatorias como piridina, alcool amilico, alcool butilico, terebintina, cloroformio, etc.

Existe efetivamente uma ligeira diferença entre a coloração produzida por soluções puras de histamina e a produzida por tais irritantes e pela «leucotaxina». Neste ultimo caso a coloração é mais intensa e localizada, ao passo que no primeiro caso a coloração é difusa e, portanto, o azul mais palido. Essa pequena diferença póde ser explicada pela diferença entre a ação da histamina injetada e a ação da histamina libertada nos proprios tecidos, em contáto direto com os pequenos vasos. De qualquer maneira parece-nos audaciosa a pretensão de fundamentar simplesmente sobre essa pequena diferença do test cutaneo, a existencia de uma nova substancia.

TABELA 7

Ação de diversos irritantes sobre a péle do coelho. (A substancia a testar era injetada intradermicamente. As indicações na tabela representam as observações 10, 20 a 30 minutos depois da injeção do corante na veia).

| Substancias injetadas intradermicamente | Aspéto do local da injeção intradermica depois da injeção de 10 cc. de azul tripan a 1 %, na veia. |
|---|---|
| *Coelho 1517* | |
| I. Histamina 1/250.000 . | Coloração homogenea extensa, ausencia de área central branca. +++ |
| II. Histamina 1/250.000 . | Idem, idem. ++ |
| III. Histamina 1/50.000 . | Halo azul (++) circundando uma zona central branca (edema). |
| *Coelho 1518* | |
| I. Terebintina 0,3% . . | Coloração azul homogenea. ++ |
| II. Piridina 1/10 . . . . | Forte edema cicundado por uma zona de intensa hiperemia. Halo azul (++) em torno. |
| III. Piridina 1/100 . . . | Grande área central de edema, circundada por uma área de hiperemia, por sua vez circundada por um halo azul. +++ |
| *Coelho 1522* | |
| I. Piridina 1/50 . . . . | Grande área central de edema, um primeiro halo de hiperemia, circundado por um halo azul. ++ |
| II. Sol. KCl a 1 % . . . | 0 |
| III. Sol. KCl a 2 % . . . | 0 ou + |

| Substancias injetadas intradermicamente | Aspéto do local da injeção intradermica depois da injeção de 10 cc. de azul tripan a 1 %, na veia. |
|---|---|
| IV. Histamina 1/100.000. . | +++ Coloração azul homogenea, ausencia de área central branca. |
| *Coelho 1524* | |
| I. Acido latico 1/100 . . | Nenhum acumulo de corante. Hiperemia intensa, adquirindo o todo uma coloração chocolate. |
| II. Acido latico 1/10 . . | Mesmo aspéto. |
| III. Acido acético 1/1 . . | Mesmo aspéto. |
| IV. Acido acético 1/100 . | Edema, mesmo tom chocolate já descrito para o ácido latico, ausência de coloração. |
| V. Alcool amilico 1/100 . | Pequeno acumulo de corante (+), hiperemia discréta. |
| VI. Alcool amilico 1/10 . . | Lesão muito semelhante á descrita para a piridina (coelho 1518, II). |
| VII. Alcool amilico 1/1 . . | Bordas fortemente azuladas, halo de hiperemia circundando uma zona central branca, de edema. Grande tendência á expansão. Ao fim de 30 minutos a lesão se estendia por enorme área, conservando sempre as mesmas caráteristicas. Ao fim desse tempo, as bordas apresentavam-se circundadas por um largo halo azul homogeneo. (+++). |
| VIII. Histamina 1/1.000.000 . | Ligeira mancha azul homogenea. +. |
| IX. Histamina 1/500.000 . . | Papula mais extensa, azul, homogenea. ++. |
| *Coelho 1525* | |
| I. Terebintina 1/800 . . | Pequena papula azul homogenea. + ou ++ |
| II. Terebintina 1/400 . . | Papula azul mais extensa, azul homogenea. ++ |
| III. Terebintina 1/200 . . | Idem, idem. +++ |
| VI. Acido latico 1/400 . . | Nenhuma reação. |
| V. Acido latico 1/100 . . | Reação semelhante á produzida em I (coelho 1524). |
| IV. Histamina 1/500.000 . . | Papula azul homogenea. +++ |
| *Coelho 1526* | |
| I. Alcool butilico 1/100 . | Ligeira coloração azul no ponto de injeção. |
| II. Alcool butilico 1/10 . . | Área central branca, de edema, halo de hiperemia, circundado por um halo azul (+++). Lesão muito semelhante á descrita em III (coelho 1518). |
| III. Alcool butilico 1/1 . | Aproximadamente o mesmo aspéto descrito em VII (coelho 1524). Forte tendência á expansão, edema e hemorrágia, circundados por halo azul (++). |
| V. Cloroformio 1/10 . . . | Zona de edema, halo de hiperemia e halo azul em torno (++). |
| IV. Cloroformio 1/100 . . | Idem, idem, (reação mais extensa). |

Observações: 1) Os sinais (+) se referem á intensidade e extensão da coloração azul, isto é, do acumulo de corante na area injetada. 2) Os numeros que indicam as diluições das substancias dificilmente soluveis na agua, representam apenas a proporção da substancia para a agua em que era emulsionada. Antes da injeção a suspensão era fortemente agitada.

As substancias acima utilizadas são fortemente irritantes, libertando provavelmente de maneira explosiva toda a histamina dos tecidos. Das substancias utilizadas, a terebintina pareceu-nos a que mais fiel-

mente reproduz, em concentrações apropriadas, o *pattern* tipico do exsudato inflamatorio.

Recentemente MENKIN (1938) desenvolveu a teoria de que a causa primaria e inicial do aumento de permeabilidade capilar na inflamação, fosse uma libertação de «leucotaxina» dos tecidos inflamados. O que ha de arbitrario nessa afirmação, mostram-no com muita clareza os dois fátos seguintes: 1.º) Nunca se demonstrou a existencia dessa substancia nos tecidos animais, nem mesmo se demonstrou ainda que ela fosse uma substancia quimicamente definivel. 2.º) A terebintina (que foi sempre utilizada por MENKIN para provocar o acumulo de exsudato na pleura de cães) quando injetada intradermicamente no coelho produz um aumento de permeabilidade capilar, acumulo de corante e de maneira nenhuma uma migração leucocitaria. Este ultimo fáto, verificado e descrito por MENKIN (1939 *b*), é uma demonstração nitida de que o efeito da terebintina não póde ser explicado por uma libertação de «leucotaxina», porquanto, de acordo com MENKIN, essa substancia hipotética produz um aumento de permeabilidade capilar, acompanhada de migração leucocitaria.

Ao contrario, a hipótese de que a histamina fosse mobilizada em todos os casos de uma ação inflamatógena, está assentada em fátos nitidos e muito bem demonstrados: 1.º) A histamina existe em quasi todos os tecidos animais, sobretudo na epiderme e nos tecidos pulmonares, em quantidade suficiente para explicar os efeitos produzidos pelos irritantes. 2.º) Substancias irritantes as mais diversas mobilizam histamina dos tecidos (FELDBERG & KELLAWAY, 1937-38, BACHMANN, 1938 e muitos outros). 3.º) Sendo a histamina desprovida de qualquer propriedade quemotactica, ela explicaria o fáto descrito por MENKIN, de que a terebintina injetada intradermicamente no coelho, embóra produzindo aumento de permeabilidade capilar, não produz migração leucocitaria. 4.º) É de salientar ainda a semelhança entre as reações produzidas pelos irritantes energicos aqui estudados e as reações produzidas por altas dóses de histamina, injetadas intradermicamente no coelho. Na tabela 7, póde-se vêr que a maioria das lesões produzidas pelos agentes inflamatogenos apresenta o *pattern* carateristico das injeções de altas dóses de histamina: zona central branca, de edema e halo periférico azul intenso. Uma brusca libertação de elevadas dóses de histamina contidas na péle do coelho explicaria facilmente os fátos acima descritos.

Em conclusão, podemos afirmar que a hipótese formulada por MENKIN, de uma libertação de leucotaxina, não só colide com certos fátos acima assinalados, como ainda se torna completamente superflua, porquanto a hipótese histaminica dá conta de todos os fátos até agora observados.

## STUDIES ON INFLAMMATION.

### IV - EXPERIENCES WITH INFLAMMATORY EXSUDATES WITH LOW HISTAMINE CONTENT.

*Abstract*

*I) This paper deals with the reactions produced in the rabbit skin by inflammatory exsudates with low histamine content, several irritative substances and histamine (Trypan blue test).*

*II) The histamine content was estimated by the* BARSOUM & GADDUM-CODE *method, the guinea-pig ileum being used for the essay. The histamine equivalents of the inflammatory exsudates here studied were lower than 1/1.000.000.*

*III) With these inflammatory exsudates a discrepancy between the reaction produced by the exsudates and their histamine extracts, as well as between the exsudates and a pure histamine solution, was observed.*

*IV) The capacity of the exsudates of liberating histamine from the guinea-pig lung is studied (Fid. 6).*

*V) The capacity of the exsudate of liberating histamine from the rabbit skin would explain the discrepancy pointed out in III.*

*VI) The lesions produced by several irritative substances (turpentine, pyridine, amylic and butylic alcohol, etc.) on the rabbit skin are studied with the trypan-blue test.*

*The similarity between these lesions and those produced by intracutaneous injections of high amounts of histamine, strongly suggests an explosive liberation of histamine in the rabbit skin. The inability of the* MENKIN'S *hypothesis of a liberation of «leucotaxine» to explain the observed facts is emphasized.*

*VII) To explain the low histamine content of the exsudates, we could admit that the liberated histamine has only a local action, diffusing for the circulating blood and diluting itself in the enormous volume of accumulated fluid. The possibility of a destruction of the liberated histamine by histaminase contained in the exsudates is presently being studied.*

## BIBLIOGRAFIA

BACHMANN, H. — 1938 — Ueber die Freisetzung von Histamin bei Gewebsschaedigungen durch Gifte. *Arch. f. exp. Path., u. Pharmak.*, **190**, 345-355.

BARSOUM, G. S. & J. H. GADDUM — 1935 — Pharmacological estimation of adenosin and Histamine. *Journ. of Physiol.*, 85, 1-14.

BIER, O. & M. ROCHA e SILVA — 1938 —Estudos sobre inflamação. I. Mecanismo do aumento de permeabilidade capilar na inflamação, com especial referencia ao papel da histamina. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9, 109-122.

CARDY & EVANS, WINTERNITZ & HIRSCHFELDER, LEWIS, MCCLELLAN & GOODPASTURE, OKUNEFF, KUSUETZOWSKY *(apud* MENKIN, 1938, *Physiol. Rev.* **18**, 366).

CODE, C. F. — 1937 — The quantitative estimation of histamine in the blood. *Journ. of Physiol.*, 89, 257-268.

DALE, H. H. — 1929 — Some chemical factors in the control of the circulation. Croonian Lectures II. *The Lancet.*, 216, 1232-1236.

FELDBERG, W. & W. J. O'CONNOR — 1937 — The liberation of histamine from the perfused lung by peptone. *Journ. of Physiol.*, 90, 288-295.

FELDBERG, W. & C. H. KELLAWAY — 1938 — The liberation of histamine by staphylococcal toxin and mercuric chloride. *The Aust. Journ. of Exp. Biol. and Med.*, 16, 249-259.

GARAN, S. R. — 1938 — Histamin-Freisetzung in der Lunge durch Reizstoffebeatmung. *Arch. f. exp. Path. und Pharmak.*, 188, 250-254.

KROGH, A. — 1929 — Anatomy and physiology of capillaries. 2nd ed. New Haven.

LEWIS, TH. — 1924 — Vascular reactions of the skin to injury. Part I. Reaction to stroking; urticaria facticia. *Heart*, 11, 119-135.

LEWIS, TH. — 1927 — Blood vessels of the human skin and their responses. London. Shaw.

LEWIS, TH. & R. T. GRANT — 1926 — Vascular reactions of the skin to injury Part VII. Notes on the anaphylactic skin reaction. *Heart*, 13, 219-225.

MENKIN, V. — 1937 — Isolation and properties of the factor responsible for increased capillary permeability in inflammation. *Proc. of the Soc. f. exp. Biol. and Med.*, 36, 164-167.

MENKIN, V. — 1938 *a* — Studies on inflammation. XIV. Isolation of the factor concerned with increased capillary permeability in injury. *Journ. of Exp. Med.*, 67, 129-144.

MENKIN, V. — 1938 *b* — Studies on inflammation. XV. Concerning the mechanism of cell migration. *Journ. of Exp. Med.*, 67, 145-152.

MENKIN, V. — 1938 *c* — Studies on inflammation. XVI. On the formation of a chemotactic substance by enzymatic action. *Journ. of Exp. Med.* 67, 153-158.

MENKIN, V. — 1938 *d* — The rôle of inflammation on immunity. *Physiol. Rev.*, 18, 366-418.

MENKIN, V. — 1939 *a* — A note on the diferences between histamine and leukotaxine. *Proc. of the Soc. f. exp. Biol. and Med.*, 40, 103-106.

MENKIN, V. — 1939 *b* — Études sur l'inflammation. *Rev. d'Immunol.*, 5, 113-137.

MITCHELL, J. S. — 1938 — The origin of the erytheme curve and the pharmacological action of ultra-violet radiation. *Proc. Royal Soc.*, *B*. 126, 241-261.

MITCHELL, J. S. & E. K. RIDEAL — 1938 — Photochemical reactions in monolayers. II. The photochemistry of proteins. *Proc. Royal Soc.*, *A*, 167, 342-367.

RAMSDELL, S. G. — 1928 — The use of trypan blue to demonstrate the immediate skin reaction in rabbits and guinea pigs. *Journ. of Immunol.*, 15, 305-311.

RIESSER, O. — 1937 — Histaminstudien. *Arch. f. exp. Path. u. Pharmak.*, 188, 1-21.

ROCHA e SILVA, M. & O. BIER — 1938 — Estudos sobre inflammação. II. Experiencias adicionais sobre a identidade da leucotaxina de Menkin e da histamina. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9, 123-131.

ROCHA e SILVA, M. & O. BIER — 1938 — Estudos sobre inflamação. III. Do fator responsavel pelo quimiotactismo positivo dos leucocitos, presente nos exsudatos inflamatorios. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9, 129-132.

ROCHA e SILVA, M. & O. BIER — 1938 — Histamina e fenomeno de Shwartzman. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 9, 133-143.

SCHILD, H. O. — 1939 — Histamine release in anaphylactic shock from various tissues of the guinea pig. *Journ. of Physiol.*, 95, 393-403.

TARRAS-WAHLBERG, B. — 1937 — Ueber den Histamingehalt der Haut nach Ultraviolettbestrahlung. *Klin. Woch.*, 16, 958-960.

# NOTAS SOBRE OS LEPIDOPTEROS QUE ATACAM OS ALGODOEIROS NO BRASIL

POR

E. J. Hambleton

Do Instituto Biologico de S. Paulo

As observações constantes deste trabalho foram realizadas com o fim de contribuir para o reconhecimento, coleção e registro das especies de lepidopteros que prejudicam os algodoais no Brasil. Essas verificações fizeram-se principalmente nas proximidades de Campinas, S. Paulo, durante os ultimos quatro anos, e por terem sido processadas acidentalmente no decurso de outras investigações, não pretendemos que estejam completas.

Com exceção de 3, as 36 especies aqui consignadas foram criadas de lagartas imaturas, achadas alimentando-se de algodoeiros. Embora muitas sejam de importancia secundaria, a maioria é constatada pela primeira vez como praga dos algodoeiros no Brasil.

O autor agradece aos seguintes especialistas do Bureau de Entomologia Norte-americano: Snrs. W. Schaus, A. Busck e Carl Heinrich, as determinações dos lepidopteros; aos Snrs. Dr. C. F. W. Muesebeck, R. A. Cushman e A. B. Gahan, as identificações dos himenopteros e ao Snr. D. G. Hall, os nomes dos dipteros. Agradece tambem ao Dr. W. T. M. Forbes, da Universidade de Cornell, identificação de alguns lepidopteros.

## MEGALOPYGIDAE

### *Megalopyge lanata* Cramer

As lagartas desta especie, comumente conhecidas como tatoranas, foram observadas alimentando-se da folhagem do algodoeiro durante Abril e Junho. Em Campinas foi colhida muito frequentemente sobre *Cupressus glauca,* sendo tambem conhecida alimentando-se de Citrus, pecegueiro, cafeeiro, jaboticabeira, etc. A ocorrencia de *M. lanata* sobre algodão é, provavelmente, acidental. Tres especimens do taquinideo *Phorocera* sp. foram obtidos parasitando as suas lagartas.

## OLETHREUTIDAE

### *Crocidosema plebeiana* Zeller

Hambleton e Forbes (4) anteriormente consignaram esta especie no Estado de Minas Gerais, mencionando sua alimentação de flôres, sementes e frutos das Malvaceas. Dentre as diversas lagartas colhidas sobre algodão em Ribeirão Preto, em Fevereiro de 1939, dois exemplares foram criados sobre os botões florais. Evidentemente é esta a primeira constatação desse inséto sobre algodoeiros.

## TORTRICIDAE

### *Argyrotaenia impositana* WALSINGHAM

As lagartas desta especie foram observadas primeiramente em Campinas, durante Março de 1936, danificando os brótos terminais dos algodoeiros. Foram tambem colhidas em Ribeirão Preto, Esp. Santo do Pinhal e Jaboticabal, no Estado de S. Paulo, sendo esta a primeira constatação deste lepidoptero como praga do algodoeiro no Brasil.

As lagartas são encontradas isoladamente no brôto terminal da planta hospedeira, no meio de diversas folhas novas que ficam agrupadas e reunidas com uma ou mais folhas sêcas. A lagarta permanece nesse esconderijo durante o dia, alimentando-se á noite do caule novo, peciolo das folhas ou folhas novas. Quando perturbadas, movimentam-se rapidamente, saindo fóra do esconderijo, caindo no chão. A lagarta crescida é esverdeada e tem numerosas cerdas no corpo; a capsula da cabeça é pálida ou amarelada. No laboratorio as femeas realizam prontamente a oviposição em cativeiro. Muitos especimens criados desde o ovo requereram de 45 a 50 dias para concluir o seu ciclo de vida, assim distribuidos: 7 dias para a incubação do ovo, 30 para o periodo larval e 10 para o estadio pupal. Nas condições do campo, completam-se, de Março até Julho, pelo menos duas gerações.

### *Platynota decerptana* ZELLER

Uma femea desta interessante especie foi criada de uma lagarta colhida nos brótos terminais de um algodoeiro, em Ribeirão Preto, em Março de 1939. Os habitos de alimentação desse inséto são semelhantes aos dos outros tortricideos que atacam o algodão.

### *Platynota rostrana* (WALKER)

A determinação de *P. rostrana* não está definida, sendo essa porém a denominação usada aqui, até que possa ser confirmada.

As lagartas desse lepidoptero foram apanhadas no mesmo algodoal que *A. impositana,* em Fevereiro de 1936, tendo sido tambem colhida em 1939, de Fevereiro a Abril, em Ribeirão Preto. E', porém, menos abundante que a anterior. Os habitos de alimentação e natureza dos estragos de *P. rostrana* são quasi identicos aos de *Argyrotaenia impositana.* A lagarta crescida é maior, distinguindo-se facilmente de *impositana* devido ao seu escudo toracico preto. O periodo pupal de cinco individuos variou entre 8 e 10 dias.

### *Platynota* spp.

Varios especimens de duas especies indeterminadas desse genero foram tambem criadas de lagartas colhidas nos algodoais em Ribeirão Preto, no decurso da ultima cultura.

## PYRALIDIDAE

### *Elasmopalpus lignosellus* Zeller

Por varios anos temos ouvido queixas quanto a uma lagartinha que causa prejuizos, durante Outubro e Novembro, nos milharais novos, nas vizinhanças de Campinas. Foi tambem observado que, onde se plantou algodão, em terreno adjacente aos campos de milho infestados, houve algum prejuizo pelas mesmas lagartas, resultando a morte das plantas novas de algodão. O inséto, identificado como *E. lignosellus*, é uma especie muito comum, já constatada por Hambleton e Forbes (4), tendo sido apanhado na luz, em Minas Gerais, desde Setembro até Novembro, em 1929.

As lagartas de *E. lignosellus* são delicadas, verde-azuladas, com listas transversais parda-escuras ou purpuras; medem cerca de 1,5 cms. de comprimento. São muito ativas, ocultando-se da luz, e quando perturbadas, movimentam-se rapidamente para esconder-se nos proprios escrementos ou no solo. Os prejuizos ás plantas são causados pela lagarta que broqueia o caule, abaixo da superficie do solo, construindo uma galeria que atinge o centro da planta. Um tubo de teia sob o solo une-se ao orificio que fez na planta e a lagarta permanece oculta dentro dele. As particulas de terra apegam-se a esse tubo e assim o inséto se protege bem contra os inimigos naturais.

Mais recentemente H. F. G. Sauer, do Instituto Biologico, registrou fortes prejuizos provocados por *E. lignosellus* nas culturas de arroz na região nordeste do Estado de S. Paulo.

### *Ephestia cautella* (Walker)

Esta especie é citada por C. Lima (2) como praga das sementes de algodão armazenado, no Nordeste e em S. Paulo; mas além disso, nada mais se conhece aqui sobre os seus habitos e extensão dos prejuizos.

### *Phlyctaenodes bifidalis* (Fabricius)

Este interessante piraustineo é conhecido ha pouco tempo como praga dos algodoeiros no Brasil. Em 1937, Sauer (6) publicou um trabalho sobre ele, constatando que as lagartas se alimentam tambem de *Amaranthus hybridus, A. spinosus, Talinum patens* e *Portulaca oleracea,* preferindo esses hospedeiros.

*P. bifidalis* foi encontrada associada com as lagartas de *Zinckenia fascialis* Cramer e um outro piraustineo indeterminado, com o qual póde ser confundido.

As observações feitas no campo, em Galia, Est. de S. Paulo, em Novembro de 1936, indicam que esse inséto passou para os algo-

doeiros, vindo dos seus hospedeiros primarios, os quais praticamente infestavam totalmente um grande campo dessa cultura. Suas lagartas podem alimentar-se de qualquer parte da planta nova, juntando ou dobrando as folhas, fazendo uma proteção nas quais permanecem ocultas. Quando inteiramente crescidas, as lagartas têm cerca de 2 cms. de comprimento, são de côr verde, com numerosos tuberculos proeminentes, de coloração parda a pardo-escura.

A fase pupal ocorre no solo. As criações feitas no insetario indicam que uma geração póde completar-se aproximadamente em 30 dias, no mês de Novembro.

### *Pococera atramentalis* (LEDERER)

Em 1926, BONDAR (1) fez a primeira referencia a essa especie como prejudicial ás folhas e frutos de cafeeiros na Baía. Encontrou-a associada a duas outras especies de microlepidopteros. Em 1930 o autor tambem colheu especimens, na luz, em Minas Gerais. Durante a presente safra (1939) um adulto de *P. atramentalis* foi criado de uma lagarta apanhada sobre algodão, alimentando-se de brótos novos, em Ribeirão Preto. A mariposa emergiu depois de um periodo pupal de 12 dias, em 17 de Março. Um outro exemplar foi obtido em 22 de Janeiro de 1938, alimentando-se de um botão floral novo, porém em Campinas. Aparentemente existe certa duvida si de fato essa especie ataca o tecido verde da planta ou si é secundaria em relação ao ataque primario de outras lagartas de lepidopteros, tal como observou TOWNSEND (8), no Perú, criando esta especie de novas maçãs, mencionando a possibilidade delas seguirem o ataque pelas lagartas de *Mescinia peruella.*

### *Zinckenia fascialis* CRAMER

Tres adultos dessa especie foram criados de lagartas obtidas, juntamente com as *P. bifidalis* (F.) sobre algodoeiros em Galia, Est. de S. Paulo, durante Novembro de 1936. As lagartas de ambas as especies passavam á cultura, vindas de outros hospedeiros, mas em condições normais não é provavel que isso se verifique.

## SATURNIIDAE

### *Automeris illustris* (WALKER)

Diversas lagartas quasi completamente desenvolvidas dessa especie foram encontradas alimentando-se sobre algodoeiros, em Campinas, desde Maio até Junho. E' ela uma das especies de *Automeris* mais comuns, tendo sido consignada sobre cerca de 15 diferentes plantas hospedeiras neste país.

### *Automeris zozine* Druce

Essa especie foi mencionada por L. Travassos (ver Costa Lima), ocorrendo sobre algodão no Rio de Janeiro. E' tambem conhecida alimentando-se de roseira, *Acalypha, Ricinus communis* e *Lonicera caprifolium,* na mesma localidade.

### *Hylesia livex* Dyar

Seis mariposas, machos e femeas, determinados temporariamente como *Hylesia livex* Dyar, foram criadas de lagartas colhidas sobre folhas de algodoeiros, em Campinas, em Maio de 1937. Os adultos emergiram de 2 a 10 de Junho.

### *Hyperdirphia multicolor* (Walker)

Uma simples lagarta dessa especie foi apanhada em algodoeiro durante Maio de 1937, emergindo o adulto depois de um periodo pupal de dois meses. Esse inséto foi tambem consignado por Travassos, sobre *Terminalia catappa* no Rio de Janeiro.

## GEOMETRIDAE

### *Vitrinella* sp.

Uma lagarta desse genero foi colhida sobre folhas de algodoeiro em Ribeirão Preto, em Março de 1939. No dia 19 do mesmo mês transformou-se em crisálida, emergindo o adulto em 8 de Abril. Outra especie, de genero indeterminado, tambem conseguida sobre algodão na mesma localidade em 23 de Fevereiro, levou 15 dias para completar o estadio pupal, emergindo um macho.

## LYONETIIDAE

### *Bucculatrix thurberiella* Busck

As lagartas desse inséto minador foram constatadas primeiramente pelo autor em Junho de 1931, sobre folhas de algodoeiros, em Viçosa, Minas Gerais. Outra vez, em Março de 1936, numerosos specimens foram colhidos alimentando-se externamente das folhas dessa planta, em Jaboticabal, S. Paulo. Essa especie não havia sido ainda registrada neste país.

Nos Estados Unidos esse minador tem causado consideraveis danos aos algodoais da California, ocorrendo tambem em outros Estados do sudoeste e Mexico.

A lagarta de *B. thurberiella* vive em uma pequena mina ou galeria sinuosa, a qual aumenta gradualmente, segundo o desenvolvimento da lagarta. Os tipos mais comuns de prejuizos, tal como se observa

em S. Paulo, são produzidos pelas lagartas mais crescidas, as quais, perfurando a página superior das folhas, dão á folhagem uma aparencia rendilhada.

Nenhuma outra especie que se alimenta sobre algodão póde ser confundida com esse lepidoptero, devido aos caracteres distintos do seu corpo. Quando completamente desenvolvida, a lagarta é esverdeada, com um par de manchas dorsais, grandes e pretas, sobre as margens de cada segmento do corpo, e com numerosos tuberculos brancos, proeminentes. Diversas lagartas colhidas no campo em fins de Março precisaram uma média de 9 ou 10 dias, depois de tecidos os respectivos casulos, para se transformarem em adulto. O casulo, branco-perola, com saliencias angulares longitudinais, é tecido sobre qualquer parte da planta.

Os adultos têm, em média, de 3,5 a 4,0 mms. de comprimento; são brancos, com marcações escuras nas patas e ao longe da margem costal e porção apical das azas anteriores.

Parece duvidoso que os prejuizos resultantes da alimentação dessa especie sobre os algodoeiros tenham maior importancia nas condições do Est. de S. Paulo, uma vez que é observada unicamente na ultima fase da estação, quando a colheita já está muito adiantada.

## GELECHIIDAE

### *Platyedra gossypiella* (Saunders)

Introduzida que foi no Brasil, a lagarta rosada disseminou-se rapidamente e hoje constitue a maior praga da cultura em todas as regiões desse país onde o algodão é cultivado. Os prejuizos são mais intensos nos Estados do sul, especialmente em S. Paulo e Minas Gerais, onde se cultivam as variedades herbaceas. Em ambos os Estados tanto as condições climaticas como as existentes depois da colheita até a nova cultura, são muito propicias ao desenvolvimento e disseminação dessa especie. As mariposas são ativas durante a maior parte do ano, e atacam os botões florais assim que estes adquirem tamanho adequado. Comparativamente, pouco prejuizo sofrem as maçãs amadurecidas mais cedo, porque a primeira, e grande parte da segunda geração se formam nos botões florais. Em Março os prejuizos são mais evidentes, e em muitas áreas uma elevada porcentagem das maçãs desenvolvidas tardiamente sofrem seriamente os danos provocados pela lagarta.

Em S. Paulo, as seguintes especies de parasitas foram criadas, da lagarta rosada: *Microbracon vulgaris* (Ashm.), *Microbracon* sp., *Calliephialtes dimorphus* Cush., *Spilochalcis simillima* (Ashm.), *Ephialtes* sp., *Perisierola nigrifemur* (Ashm.) e *Apanteles* sp.

## COSMOPTERYGIDAE

### *Pyroderces rileyi* (WALSINGHAM)

Frequentemente essa especie, cujas lagartas são comumente designadas por falsa lagarta rosada, é obtida de capulhos velhos e em decomposição, no laboratorio de Campinas. Foram criadas de capulhos atacados pela lagarta rosada, a qual póde ser facilmente confundida com as lagartas de *P. rileyi*. A falsa lagarta rosada não é uma especie prejudicial, pois é saprofaga, sobre restos de algodão.

## GRACILARIIDAE

### *Acrocercops helicometra* MEYRICK

Esse pequeno minador do algodão é de ocorrencia muito frequente, e está muito disseminado pelo Brasil. Póde ser comumente observado na maioria dos algodoais, de fins de Fevereiro até Julho. As lagartas fazem primeiramente galerias sinuosas, porém mais tarde a zona de alimentação confina-se a uma região na qual produzem uma mancha larga sob a epiderme da folha. Geralmente, por cima da parte atacada, a epiderme séca e é destruida. BONDAR (1) consignou essa especie na Baía e descreveu os seus estadios imaturos.

Um pequeno himenoptero parasita, *Elasmus chapadae* ASHMEAD, foi criado de uma pupa dessa especie minadora, colhida em Campinas em Abril de 1936.

## LYMANTRIIDAE

### *Thagona* sp.

Em Maio de 1936 foram colhidas sobre folhas de algodoeiros, proximos de Campinas, duas lagartas meio crescidas, dessa especie. Colocadas em tubos de vidro e providas com folhas de algodão, ambas continuaram crescendo até 19 de Maio, quando passaram á fase prepupal, assim permanecendo durante os mêses de inverno, até Setembro, quando em 11 e 16 se crisalidaram. Um macho e uma femea emergiram, respectivamente em 7 e 5 de Outubro. Aparentemente é uma especie muito rara. Um dos especimens, enviado ao Museu Nacional N. Americano, foi determinado pelo Snr. W. SCHAUS como especie nova.

## NOCTUIDAE

### *Alabama argillacea* (HÜBNER)

Essa especie, muito conhecida como curuquerê, é uma constante ameaça para a cultura durante as estações chuvosas na maioria dos anos. Aparece em regra e esporadicamente em numero reduzido durante Novembro e Dezembro, não se tornando muito evidente até que se processem as segunda e terceira gerações. Tres ou quatro pulve-

rizações arsenicais são geralmente suficientes para controlar a praga, salvo si os periodos chuvosos se prolongam por muito tempo durante os mêses de Janeiro e Fevereiro, favorecendo o seu desenvolvimento e prejudicando muito o combate. As pulverizações continuam muitas vezes até Março ou até que se inicie a colheita. Em outras regiões onde o combate é feito negligentemente, acontece que o inséto desfolha campos inteiros. Em outras zonas do Estado, durante as quatro ultimas safras foi observado que essa praga não aparece, ou, aparecendo, é em tão pouca quantidade que as medidas de combate não se justificam.

Em São Paulo o curuquerê é parasitado por muitas especies de himenopteros e dipteros. Dos que assinálamos, muitos o foram pela primeira vez no Brasil. Dentre as especies criadas contam-se as seguintes: *Euplectrus comstocki* How., *Spilochalcis immaculata* (Cress.), *Spilochalcis* sp., *Eupelmus cushmani* Craw., *Anastatus coreophagus* Ashm., *Apanteles* n. sp., *Hemiteles* n. sp., *Rogas* n. sp., *Neotheronia brullei* var. *nigrescens* Krgr., *Zacharops* n. sp., *Charopsimorpha* sp., todas criadas da lagarta e *Brachymeria ovata* (Say) da lagarta e crisalida de *Alabama argillacea.* Uma especie indeterminada de *Trichogramma* foi criada dos ovos do curuquerê em Abril de 1936. Em Minas Gerais, durante Junho de 1931, as ultimas crisalidas de *A. argillacea* colhidas no campo estavam cheias de ninfas de uma especie de *Tetrastichus.*

Dos dipteros parasitas, contam-se os seguintes: *Eucelatoria australis* Tns., *Pygophorinia peruviana* Tns. e *Sarcophaga* sp., criadas das lagartas; *Patelloa similis* Tns. e *Phorocera floridensis* (Tns.) das crisalidas e *Sarcophaga lambens* Wd. de lagarta e crisalida.

Dois pentatomideos predadores que ocorrem nos campos muito atacados pelo curuquerê foram determinados por H. G. Barber, do Museu Nacional Norte-americano, como *Podisus sagitta* (F.) e *Alcaeorrhynchus grandis* (Dall.).

### *Anomis doctorium* Dyar

Esta especie foi mencionada primeiramente por Fonseca (3) como praga de *Hibiscus bifurcatus,* mas as mariposas por ele criadas eram *Anomis ellita* Guen. (det. W. Schaus), especie muito proxima. As mariposas de *A. illita* são ligeiramente menores do que as de *doctorium* e de coloração mais viva. Podem tambem ser distinguidas pela margem externa da aza anterior, a qual é mais réta em *illita* do que em *doctorium.* As lagartas de *A. doctorium* foram achadas nos algodoeiros de Jaboticabal (S. Paulo) em Março de 1936, numa cultura muito atacada por *Alabama argillacea.* Na aparencia geral as lagartas destas duas especies

são muito semelhantes, sendo os seus habitos diferentes. As lagartas de *doctorium* são encontradas individualmente, tendo sido colhidas de plantas diversas em varios locais da cultura. Alimentam-se de folhas, e durante o dia permanecem escondidas nas partes florais ou na base das maçãsinhas. As lagartas, criadas em laboratorio, em tubos de vidro, encrisalidaram, emergindo os adultos durante Abril e Maio.

### *Feltia annexa* (TREITSCHKE)

As lagartas dessa especie são, de todas as encontradas nos algodoais de Outubro a Abril, as mais frequentes das chamadas *lagartas roscas*. Os prejuizos provêm dos habitos que têm, de cortar as plantas, umas proximo da superficie do solo ou, como nas plantas mais velhas, as folhas, alimentando-se delas depois de caídas no chão. As lagartas de *F. annexa* escondem-se no solo durante o dia, geralmente enrolada e um pouco coberta com terra solta sob uma folha ou outra parte da planta, no chão. No campo ficam cobertas de pó, não sendo facilmente encontradas. Esta especie tem sido observada muito disseminada pelo Estado, mas nunca ocasionando danos apreciaveis. Dois especimens de um taquinideo *Cuphoceropsis fascialis* TNS. foram criados de lagartas colhidas em Capivarí (S. Paulo), em Outubro de 1936. Uma das moscas transformou-se em pupa no dia 17 de Outubro e a outra no dia 28 do mesmo mês. Ambas emergiram em Novembro, uma no dia 9 e a outra em 18.

### *Heliothis armigera* (HÜBNER)

Tanto quanto foi possivel observar, esse inséto é de pouca importancia economica como praga do algodoal em S. Paulo. Sómente em duas ou tres ocasiões tivemos a nossa atenção voltada para os danos por ela causados nas maçãs verdes. Essa especie é muito conhecida como praga do milho e tomate, neste país, sendo os prejuizos mais vultosos geralmente durante as estações das chuvas mais abundantes. Sua atividade é principalmente limitada ao milho, mesmo quando os algodoais são plantados em terrenos adjacentes, para os quais podia-se supor que passassem quando o milho estivesse maduro. Nessa época, porém, os algodoais têm muitas maçãs já maduras, e pouco prejuizo seria verificado caso isso efetivamente se verificasse.

Em Viçosa (Minas Gerais), foi criado de *H. armigera*, em 24 de Setembro de 1932, um especimen de uma mosca determinada como *Archytas* sp.

### *Heliothis virescens* (FABRICIUS)

Antes de 1935, *H. virescens* não havia sido constatada no Brasil. Nesse ano a Secção recebeu um lote de lagartas quasi completamente crescidas, dessa especie, com a informação de que estavam atacando

maçãs verdes de algodoeiros no municipio de Marilia. Essas lagartas concluiram o periodo de alimentação, transformaram-se em crisalidas, emergindo os adultos em Março. De material identico, provindo de Mogy Guassú, os adultos foram obtidos em Abril de 1935.

Desde esse ano foi observado que as infestações variavam de ligeira a muito severas, nos algodoais das zonas norte e noroeste do Estado. Numa grande plantação, cerca de 50 kms. a oeste de Nova Granada, houve em Fevereiro de 1938 um forte ataque por *H. virescens;* 4 ou 5 alqueires de algodão foram quasi totalmente destruidos. Essa infestação estava localizada no centro de um campo de 30 alqs., em que, no ano anterior, havia sido cultivado milho pela primeira vez. Antes desse plantio, o terreno estava em mata virgem, parecendo que essa especie atacou os algodoais depois de ter sido eliminado o hospedeiro natural daquela localidade.

Durante Fevereiro e Março de 1939, muitas lagartas pequenas de *H. virescens* foram colhidas em Ribeirão Preto, alimentando-se de botões florais dos algodoeiros. As pulverizações arsenicais frequentes reduziram ao minimo os prejuizos verificados nas maçãs maduras.

### *Laphygma frugiperda* (Smith & Abbot)

Eventualmente essa especie tem sido constatada prejudicando as folhas dos algodoeiros. A sua ocorrencia no algodão parece mais acidental, desde que seus hospedeiros preferidos são os capins e especialmente o milho, o qual é frequentemente muito prejudicado. E' mais comumente encontrada em Campinas nos mêses de Janeiro a Abril. Um taquinideo parasita criado de uma lagarta colhida sobre capim, foi determinado como *Pseudokea* sp.

### *Monodes agrotina* Walker

As lagartas dessa especie foram constatadas alimentando-se de folhas nos algodoais do municipio de Limeira, em fins de Dezembro de 1935. No laboratorio elas se alimentavam facilmente de folhas verdes, completando o desenvolvimento em Janeiro. Nenhuma outra observação foi feita sobre esse inséto.

### *Plusia oo* Cramer

Os primeiros individuos dessa especie foram obtidos das lagartas encontradas sobre «feijão de boi», *Meibomia pabularis,* na Secção de Botanica, São Paulo, em Março de 1935. No ano seguinte, no mesmo mês, varias lagartas quasi crescidas foram apanhadas sobre algodão, em Jaboticabal. Noutra ocasião, em Maio, foi colhido mais material, em Leme.

De acordo com W. T. M. FORBES, que determinou o material, *Plusia oo* é comum e muito difundida na America do Sul. Essa especie é polífaga, tendo WOLCOTT (9) constatado em Puerto Rico, alimentando-se de fumo, tomate, feijão e repolho. Apesar de haver o autor, em 1933, no Estado de Minas Gerais, coletado mariposas na luz, a ocorrencia dessa especie como praga constitue uma nova constatação para o Brasil. A lagarta adulta de *Plusia oo* é verde-palido a verde-escuro, com numerosas manchas esbranquiçadas e pequenas, no dorso; é alongada e muito mais forte do que o curuquerê. Tem sómente tres pares de falsas patas sobre os segmentos abdominais posteriores e a sua locomoção é tipica dos mui conhecidos mede-palmos da familia Geometridae. No campo as lagartas foram encontradas na superficie inferior das folhas velhas, das quais se tinham alimentado. A crisalidação se processa em casulo muito delicado, esbranquiçado e transparente, feito na base da folha. A crisalida é verde, com zonas pardo-escuras em diversos segmentos dorsais. Um individuo colhido em 23 de Março passou ao periodo prepupal em 1.º de Abril, encrisalidando-se no dia 3. Nenhum casulo foi tecido neste caso e o periodo pupal verificou-se dentro de um tubo de vidro, no qual fôra criado. A mariposa emergiu em 14 de Abril. As lagartas de *Plusia oo* colhidas sobre o algodão, em Leme, e em tomate, em Campinas, durante 1936, estavam parasitadas por um taquinideo *Voria ruralis* (FALL.).

### *Prodenia latifascia* WALKER

Não obstante não ter sido mencionado no catalogo de COSTA LIMA, esta especie é a mais comum das lagartas roscas encontradas nos campos de algodão do Estado. Talvez as especies *ornithogalli* e *dolichos,* muito semelhantes, tenham sido confundidas com *latifascia,* pois estas são as unicas do genero constatado aqui como praga de importancia economica. Ambas as variedades de *latifascia,* a clara e a escura, foram criadas de material colhido no campo em Minas Gerais e São Paulo.

As larvas de *P. latifascia* são de côr cinzenta a preta, com duas fileiras subdorsais de marcas pretas triangulares. São as maiores larvas de noctuideos que se alimentam do algodoeiro. Ambas as larvas, imaturas e maturas, têm sido encontradas muitas vêzes durante o dia nas folhas dos algodoeiros. No campo são comumente encontradas na parte inferior da folhagem ou na terra, sob o cisco. Consideraveis danos causam aos algodoeiros novos durante Outubro e Novembro, mas a especie é geralmente encontrada durante quasi toda a estação algodoeira. Em uma ocasião foi observada alimentando-se de maçã verde, de algodão.

Este inseto foi tambem criado de larvas colhidas de plantas de café e batatinha.

### *Xylomiges eridania* (CRAMER)

Essa é tambem uma especie de lagarta rosca frequentemente observada atacando plantas novas de fumo neste país. Alimenta-se principalmente de plantas não cultivadas, mas já foi encontrada danificando tomates, batatas e tung-oil, no Brasil.

Diversas lagartas imaturas foram colhidas de algodão e criadas em Campinas, em 1936. No mês de Maio a crisalidação foi em média de 18 dias para os 4 adultos criados. Tambem em Ribeirão Preto, em Março de 1939, foi igualmente colhida em fumo. Das lagartas de *Xylomiges eridania* em Junho de 1936, foram criados varios especimens do diptero parasita *Hemimasipoda pinguis* (F.).

### *Thyreion gelotopoeon* DYAR

Um unico adulto desse interessante noctuideo foi obtido em fins de Março de 1939, de uma lagarta encontrada alimentando-se numa maçã verde de algodão, em Ribeirão Preto, no dia 3 desse mesmo mês. O especimen foi identificado por comparação com um exemplar de J. C. PAZ (Argentina), colhido e determinado pelo Dr. PABLO KOHLER. Esta constatação é tambem nova para o Brasil, representando a terceira especie de Noctuidae conhecido que se alimenta de maçãs verdes de algodão, neste país.

A lagarta completamente crescida de *T. gelotopoeon* é avermelhada, pardacenta e esverdeada, com uma larga faixa pálida ao longo de ambos os lados. Numerosas faixas, escuras, curtas e finas, marcam a área dorsal. A mariposa de S. Paulo é maior do que a da Argentina, um tanto mais clara, porém praticamente identica nos outros caracteres. E' de côr verde-oliva-palido, com traços castanho-bronzeados, especialmente na asa anterior. As posteriores são pálidas, excéto a mancha larga escura ao longo da margem externa, que tem duas pequenas manchas pálidas que convergem para um ponto situado no meio da linha que une o apice ao angulo anal. A envergadura é aproximadamente de 4 cms.

## ARCTIIDAE

### *Ecpantheria campinasa* SCHAUS

Duas lagartas de um arctideo desconhecido, colhidas das folhas inferiores de algodão, em principios de Julho de 1936, foram criadas, tendo-se obtido os adultos em 15 e 18 de Julho, respectivamente. Uma femea enviada ao Museu Nacional dos Estados Unidos para identificação foi determinada por WM. SCHAUS (7) como nova especie, e descrita sob o nome *Ecpantheria campinasa*.

### *Maenas bilinea* SCHAUS

As lagartas dessa especie foram colhidas em diversas ocasiões no decurso de Abril de 1936. O casulo é delicado, de côr pardo-escura, composto quasi completamente dos pêlos da lagarta. Uma femea encrisalidou-se em 6 de Abril, e no dia 28 emergiu o adulto. Uma outra permaneceu 18 dias na forma de crisalida, emergindo o adulto no dia 12 de Maio.

### *Opharus astur* (CRAMER)

As lagartas foram colhidas diversas vêzes nos algodoais em Campinas. Seu casulo delicado, feito principalmente com pêlos da lagarta, une-se á superficie inferior da folha. Os adultos emergiram de Dezembro a Julho. Essa especie foi criada tambem de goiabeira, *Bidens pilosa* e outra especie de Compositae, em Campinas. Em Santa Catarina, HOFFMANN (ver COSTA LIMA), constata-a sobre *Salvia splendens* e *Pelargonium*. No Rio Grande do Sul, alimenta-se de *Latropus* sp. e *Celtis* sp.

### *Utethesia ornatrix* (LINNEUS)

Essa é uma especie muito comum e muito difundida neste país. Alimenta-se de varias especies de crotalarias. No Estado do Maranhão, IGLESIAS (5) refere tê-la colhido sobre algodão.

Embora *U. ornatrix* nunca tivesse sido observada alimentando-se dessa planta no sul do Brasil, os adultos são frequentemente vistos nos algodoais ou nas suas proximidades, de Abril até Junho.

## NOTES ON LEPIDOPTERA AFFECTING COTTON IN BRAZIL

### *Abstract*

*Observations on many known and heretofore unrecorded species of Lepidoptera affecting the cotton plant in Brazil are presented for the purpose of assisting in the collection and recognition of these forms. Of the 36 species listed, the majority have been reared to maturity from immature larvae collected in the field. The hymenopterous and dipterous parasites reared from many of the species reported herein are also included.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — BONDAR, G. — 1926 — Relatorios sobre diversas culturas. *Bol. do Lab. Path. Veg.*, 3: 97 pp.

2 — COSTA LIMA, A. DA — 1936 — Terceiro catalogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. *Min. da Agr.*, Rio de Janeiro, 460 pp.

3 — FONSECA, J. P. — 1934 — Relação das principais pragas observadas nos anos de 1931, 1932 e 1933, nas plantas de maior cultivo no Estado de S. Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 5: 263-289.

4 — Hambleton, E. J. e Forbes, W. T. M. — 1935 — Uma lista de Lepidoptera do Estado de Minas Gerais. *Arq. Inst. Biol.*, 6: 213-256.

5 — Iglesias, F. — 1916 — Insetos nocivos e uteis ao algodoeiro. *Bol. de Agr.*, 17: 968-997.

6 — Sauer, H. F. G. — 1937 — O aparecimento de Phlyctaenodes bifidalis (Fab.) como praga do algodoeiro no Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 8: 201-210, figs.

7 — Schaus, Wm. — 1938 — New species of American Heterocera in the United States National Museum. *Ann. and Mag. Nat. Hist.*, Ser. 11, vol. ii: 504-517.

8 — Townsend, C. H. T. — 1928 — Insetos que atacan al algodón y a la caña de azúcar en el Perú. *Est. Exp. Agr. de la Soc. Nac. Agr.*, Bol. n.º 1, 29 pp., figs.

9 — Wolcott, G. N. — 1936 — «Insectae Borinquensis», A revised annonated check-list of the insects of Puerto Rico. *Jour. Agr. Univ. Puerto Rico*, 20: 627 pp., figs.

Vol. 10 — Art. 16 Dezembro de 1939

# ESPECIFICIDADE SOROLOGICA DE AZOPROTEINAS SULFANILAMIDICAS

POR

Q. Mingoja & M. Rocha e Silva

Do Instituto Biologico de S. Paulo

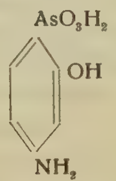
A opinião de EHRLICH de que as propriedades sorologicas estão intimamente relacionadas com a estrutura quimica, recebeu um grande apoio das experiencias classicas de OBERMAYER e PICK (1906). Estes AA. mostraram que o tratamento por reativos quimicos especiais, como acido nitrico ou agentes iodurantes, muda consideravelmente o comportamento sorologico das proteinas. A especificidade original destas desaparece ou é mascarada por uma nova especificidade relacionada com o reativo quimico utilizado no tratamento. Tambem a introdução de grupos determinados na molecula proteica mediante reações de diazotação e copulação condúz a uma mudança similar do comportamento sorologico. A manifestação mais acentuada dessa alteração do comportamento sorologico consiste no fáto de que todas as proteinas tratadas de modo similar provocam a formação de anticorpos que reagirão indiferentemente com qualquer complexo proteico preparado com o mesmo composto quimico. Esses complexos antigenicos artificiais, obtidos principalmente pela copulação de uma molecula proteica com um sál de diazonio, foram estudados por LANDSTEINER e COL.

Os produtos corantes obtidos pela copulação de um sál de diazonio com proteinas, constituindo complexos designados como *azoproteinas*, gozam da propriedade de excitar a formação de anticorpos que reagirão com outros complexos azoproteicos, cuja proteina póde ter a procedencia mais diversa. Ao contrario, pequenas modificações na molecula do sál de diazonio que serviu para a copulação limitam consideravelmente a intensidade das reações cruzadas, podendo mesmo anula-las completamente. Assim, essa nova especificidade introduzida na molecula proteica permite uma caraterização, muitas vezes perfeita, da substancia utilizada na preparação do sál de diazonio. A diferenciação sörologica de compostos os mais diversos constitue hoje um dos capitulos mais interessantes e vastos da sorologia e não caberia aqui uma resenha completa dos trabalhos acumulados (para maiores detalhes ver LANDSTEINER, 1936; MARRACK, 1938).

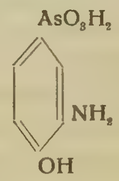
Um aspéto interessante da questão foi abordado em 1934 por ERLENMEYER e BERGER, que estudaram a especificidade sorologica de

derivados pyrazolonicos, como antipirina, aminoantipirina, piramido, etc. e puderam demonstrar uma correlação entre o comportamento sorologico e a atividade farmacologica, antipiretica. Concluiram que tanto a especificidade sorologica como a atividade antipiretica, estão ligadas ao esqueleto $C_6H_5$-N-N-$CH_3$.
| |

Recentemente (1939) KOSSOVITCH e ADRA estudaram o comportamento sorologico de dois derivados de acidos oxi-arsanilicos: 269 F (acido p-amino-o-oxifenilarsinico) e 189 F (acido m-amino-p-oxifenilarsinico), que não diferem senão pela posição das funções — NH² e — OH no nucleo benzenico:




269 F




189 F

Esses dois isomeros são neurotoxicos e diferem pela posição dos grupos substituintes na molecula aromatica. Ora, foi possivel uma diferenciação sorologica absoluta entre os dois produtos, o que, segundo os autores, constituiria uma demonstração da teoria de EHRLICH, de que a função neurotoxica e a função antigenica constituem dois grupos diferentes na molecula proteica: um grupo toxóforo e um grupo haptóforo.

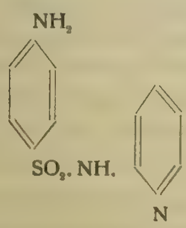
Para introduzir especies na molecula proteica, além do metodo das azoproteinas, hoje em dia é tambem utilizado o metodo chamado das aril-ureido-proteinas. Este processo, devido a antigas observações de RAEPER, sucessivamente estudadas por HOPKINS e WORMALL, baseia-se na reação entre isocianatos e aminas: uma molecula de isocianato arilico qualquer Ar. N. CO pode adicionar-se a um grupo aminico livre de uma proteina, dando uma aril-ureido-proteina correspondente á formula geral:

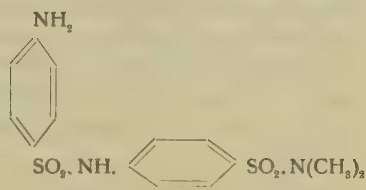
Ar. NH. CO. NH. Prot.

Este composto apresenta função antigenica em relação ao grupo aromatico Ar introduzido; eis por que CREECH e FRANKS, mediante isocianatos de hidrocarburetos polinucleares cancerigenos, tentaram preparar antisoros contra esses agentes provocadores do cancer experimental. Entretanto, preparar uma azoproteina é muito mais simples do que uma aril-ureido-proteina; é indispensavel porém, na molecula que se pretende fixar á proteina, a presença de um grupo aminico primario,

ligado a um atomo de carbono nuclear. Este grupo, presente nos compostos arsenicais acima lembrados, existe tambem em varios medicamentos quimioterapicos antibacterianos como a sulfanilamida I, a sulfapiridina II e o uliron III:

I. 

II. 

III. 

Apezar dos numerosos trabalhos publicados até hoje, o mecanismo de ação destes medicamentos sulfamidicos não está perfeitamente esclarecido; entretanto, em artigos precedentes, um de nós mostrou que condição necessaria mas não suficiente para que um composto apresente atividade quimioterapica antibacteriana é a presença do esqueleto fundamental (IV):

IV. 

Este esqueleto fundamental existe nos tres medicamentos lembrados; pareceu-nos portanto interessante estudar: a) se é possivel diferencia-los sorologicamente, quer entre si, quer em comparação com compostos para-disubstituidos, mas sem o esqueleto IV; b) se o mesmo agrupamento determina a atividade antibacteriana e a especificidade sorologica.

Os compostos utilizados para as nossas experiencias foram: sulfanilamida ou 1162 F (formula I); sulfapiridina ou composto M & B 693 (formula II); uliron ou Diseptal A (formula III); acido sulfanilico e acido arsanilico (sob forma de atoxyl). Como é sabido, destes compostos sómente os tres primeiros apresentam atividade antibacteriana.

A sulfanilamida, a sulfapiridina e o acido sulfanilico foram preparados por nós mesmos; o uliron foi-nos graciosamente fornecido pela Casa Bayer, á qual vivamente agradecemos.

Os azoantigenos para imunização foram preparados só com sulfanilamida e sulfapiridina mediante o metodo comum, preconizado por H. Pauly, isto é: diazotação da sulfamida com acido cloridrico e nitrito de sódio, copulação com sôro de cavalo em ambiente alcalino, precipitação e purificação do azocomposto obtido com a técnica abaixo indicada.

## METODOS

Imunização dos coelhos — Os coelhos receberam 14 injeções distribuidas no intervalo de um mês. De ordinario a primeira injeção era feita na veia e as seguintes no peritonio. Os coelhos foram separados em duas séries *A e B*. A série *A* recebeu injeções de um azo composto preparado copulando sôro de cavalo com o preparado 693 (sulfapiridina). A série *B* recebeu injeções de um azo composto preparado conjugando sôro de cavalo e sulfanilamida (preparado 1162). Cinco a sete dias depois da ultima injeção os coelhos eram sangrados a branco.

Preparação dos azo-antigenos para a imunização — 1) 0,86 g. de sulfanilamida ou 1,25 g. de sulfapiridina (1/200 mol) foram tratados com 10 cc. de HCl concentrado e 25 cc. de agua distilada. Á mistura, resfriada a 0°, foi acrescentado nitrito de sódio em solução a 10 % até reação franca com o papel amidoiodurado (quantidade teórica 0,35 g. $NaNO_2$). 2) A 50 cc. de sôro de cavalo resfriado a 0°, mediante gelo, juntaram-se 75 cc. de solução de carbonato de sodio a 20 %. 3) A solução preparada em 1, foi ajuntada ao sôro de cavalo resfriado, obtendo-se então a azo-proteina de côr vermelha completamente soluvel. 4) Depois de permanecer em repouso durante 1 hora, a 0°, precipitou-se o azo-composto mediante HCl, diluido com igual volume de agua. O acido foi ajuntado até reação francamente acida. 5) Depois de permanecer de um dia para outro na geladeira, o azo-derivado, precipitado, foi colhido por filtração sobre Buchner, lavado duas vezes com agua distilada e em seguida disolvido em solução de carbonato de sódio. A reação final era ajustada á neutralidade ou a uma ligeira alcalinidade. O volume finalmente era levado a 50 cc.

Antigenos para os tests sorologicos — As azo-proteinas usadas para os tests eram preparadas de maneira similar, utilizando-se, entretanto, sôro de carneiro, em vez de sôro de cavalo, de maneira a evitar reações especificas de especie. Prepararam-se cinco azo-derivados com sôro de carneiro, utilizando-se para a copulação os preparados seguintes: 1162 (sulfanilamida), 693 (sulfapiridina), diseptal A (Uliron, Bayer), atoxyl e acido sulfanilico.

Tests de precipitação — Os tests foram realizados da maneira habitual, diluindo-se o antigeno: sôro de carneiro-hapteno, em agua fisiologica, a partir de uma concentração 1/50.

Reações de inibição — Os tests de inibição foram realizados da seguinte maneira: Soluções a 0,2 % dos haptenos em agua fisiologica, foram misturadas com soluções muito diluidas dos antigenos

(1/100 a 1/400). O ratio Hapteno/Antigeno, que aparece nas tabelas, representa as quantidades relativas em cc. dessas duas soluções (o volume final era completado a 2 cc. com agua fisiologica). Uma pequena quantidade do sôro era colocada cuidadosamente formando uma camada bem delimitada na parte inferior. De ordinario 20 a 30 minutos na estufa a 37º eram suficientes para uma leitura definitiva.

## RESULTADOS

### REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO

Foi possivel separar as soluções estudadas em dois grupos bem definidos. Os dois compostos 1162 e 693 diferenciaram-se sorologicamente de maneira apenas quantitativa, reagindo o sôro dos animais imunizados com azo-derivados preparados com qualquer um dos dois, fortemente com o azo-derivado homologo e menos fortemente com o azo-derivado heterologo. Uma especificidade parcial, portanto, foi observada, mesmo em relação a esses dois compostos. Os antigenos azo-derivados, preparados copulando sôro de carneiro com os outros tres compostos, atoxyl, diseptal e acido sulfanilico, não produziram nenhuma reação cruzada com os sôros dos coelhos imunizados com os complexos antigenicos: sôro de cavalo-1162 e sôro de cavalo-693.

As tabelas 1 e 2 mostram duas experiencias tipicas.

TABELA 1

Sôro n.º 4861, contendo anticorpos contra sôro de cavalo conjugado com o preparado 1162 (sulfanilamida). Azo-antigeno, sôro de carneiro conjugado com os haptenos indicados.

| Diluição do antigeno | Azo-antigenos | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Anti-1162 | Anti-693 | Anti-Uliron | Anti-Acido Sulfan. | Anti-Atoxyl |
| 1/50 . . . . . | ++++ | +++ | — | — | — |
| 1/100 . . . . . | ++++ | +++ | — | — | — |
| 1/200 . . . . . | +++ | ++ | — | — | — |
| 1/400 . . . . . | +++ | + | — | — | ± |
| 1/800 . . . . . | ++ | ± | — | — | tr. |
| 1/1600 . . . . . | ++ | — | — | — | — |
| 1/3200 . . . . . | + | — | — | — | — |
| 1/6400 . . . . . | tr. | — | — | — | — |

TABELA 2

Sôro n.º 4856, contendo anticorpos contra sôro de cavalo conjugado com o preparado 693 (sulfapiridina). Azo-antigeno, sôro de carneiro conjugado com os haptenos indicados.

| Diluição dos antigenos | Azo-antigenos | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Anti-1162 | Anti-693 | Anti-Uliron | Anti-Acido Sulfan. | Anti-Atoxyl |
| 1/50 . . . . . | +++ | +++ | — | — | — |
| 1/100 . . . . . | +++ | +++ | — | — | — |
| 1/200 . . . . . | ++ | ++ | — | — | — |
| 1/400 . . . . . | ++ | ++ | — | — | — |
| 1/800 . . . . . | ± | + | — | — | — |
| 1/1600 . . . . | — | — | — | — | — |

A aparente discrepancia entre as tabelas 1 e 2, de que o sôro de coelho imunizado com o azo-1162 reage mais fortemente com o sôro homologo, ao passo que o sôro do coelho imunizado com o azo-693 reage quasi igualmente com os sôros homologo e heterologo, déve provir de uma diferença de concentração dos antigenos utilizados no test, contendo o azo-antigeno 1162 mais azo-proteina que o antigeno 693. O que verificamos repetidamente, sobretudo em reações de inibição, é que a inespecificidade das reações cruzadas dos antigenos preparados com os dois compostos 1162 e 693 é incompleta, podendo-se nitidamente distinguir um do outro sorologicamente. A tabela 3 mostra duas experiencias realizadas com sôros menos potentes do que os usados nas experiencias anteriores. Foi então possivel separar sorologicamente com muita nitidês, os dois compostos referidos.

TABELA 3

| Diluição dos antigenos | Sôro n.º 6083 (anti-1162) testado com azo-antigenos | | | Sôro n.º 6084 (anti-693) testado com azo-antigenos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Anti-1162 | Anti-693 | Anti-Uliron | Anti-1162 | Anti-693 | Anti-Uliron |
| 1/50 . . . . | ++ | — | — | — | ++ | — |
| 1/100 . . . | ++ | — | — | — | + | — |
| 1/200 . . . | ++ | — | — | — | ± | — |
| 1/400 . . . | + | — | — | — | tr. | — |
| 1/800 . . . | tr. | — | — | — | — | — |
| 1/1600 . . . | — | — | — | — | — | — |

Os resultados concordantes das reações de inibição mostraram ainda, como veremos adiante, que embora apresentando reações cruzadas, os azo-derivados preparados com os compostos 1162 e 693, pódem ser distinguidos sorologicamente.

Uma primeira explicação para as reações cruzadas obtidas com os azo-derivados preparados com os compostos 1162 e 693, poderia ser a existencia do radical $NH_2C_6H_4 — SO_2 — NH$ — presente num e noutro composto. O fato de que tambem a atividade farmacologica dos preparados acima estudados depende daquele radical, aproximaria os nossos resultados dos obtidos por ERLENMEYER & BERGER (1934), que mostraram que a especificidade de certos derivados pirazolonicos dependia do esqueleto $C_6H_5 — \underset{|}{N} — \underset{|}{N} — CH_3$, tambem responsavel pela atividade antipiretica. Entretanto, a ausencia de qualquer reação cruzada entre os azo-compostos preparados com aquelas substancias e o azo-derivado: sôro de carneiro-Uliron, contendo este hapteno tambem aquele radical e sendo dotado de forte atividade anti-bacteriana, diminuiu a importancia daquela correlação.

## REAÇÕES DE INIBIÇÃO

Utilizamos nesta parte do trabalho os azo-antigenos sintetizados com os preparados 1162 e 693 copulados com proteina de sôro de carneiro. Os haptenos empregados foram exclusivamente os tres seguintes: 1162, 693 e acido sulfanilico. Os resultados obtidos concordaram integralmente com os já descritos e obtidos com tests de precipitação As tabelas 4 e 5 resumem duas experiencias tipicas.

TABELA 4

Sôro n.º 6086, contendo anticorpos contra sôro de cavalo conjugado ao hapteno 1162. Azo-antigeno: sôro de carneiro conjugado ao hapteno 1162.

| Hapteno | Concentrações: Ratio $\frac{\text{Hapteno}}{\text{Antigeno}}$ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $\frac{1,5}{0,5}$ | $\frac{1,0}{0,5}$ | $\frac{0,5}{0,5}$ | $\frac{0}{0,5}$ |
| 1162 . . . . . . . | 0 | 0 | tr. | ++ |
| 693 . . . . . . . . | + | + | ++ | ++ |
| Acido sulfanilico . . | ++ | ++ | ++ | ++ |

Observações: *Hapteno:* sol. a 0,2% dos compostos indicados.
*Antigeno:* sol. a 1/400 do azo-antigeno.

TABELA 5

Sôro n.º 6087, contendo anticorpos contra sôro de cavalo conjugado com o preparado 693. Azo-antigeno: sôro de carneiro conjugado ao preparado 693.

| Hapteno | Ratio Hapteno / Antigeno | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $\frac{1,5}{0,5}$ | $\frac{1,0}{0,5}$ | $\frac{0,5}{0,5}$ | $\frac{0}{0,5}$ |
| 693 . . . . . . . . | 0 | 0 | tr. | ++ |
| 1162. . . . . . . . | ± | ± | + | ++ |
| Acido sulfanilico . . | ++ | ++ | ++ | ++ |

Pode-se ver que foi possivel demonstrar, não só com os tests de precipitação, mas tambem com as reações de inibição, a existencia de reações cruzadas entre os sôros de coelhos imunizados com os azo-antigenos 1162 e 693 e os respetivos azo-antigenos e haptenos. Entretanto as reações homologas foram muito mais fortes que as heterologas, o que permite uma distinção sorologica nitida entre os dois haptenos citados. A distinção sorologica entre os compostos 1162 e 693 de um lado e o acido sulfanilico de outro, foi entretanto absoluta, mostrando-se, soluções de acido sulfanilico, incapazes de inibir a reação de precipitação sôro anti-1162 ⋈ anti-1162, bem como a reação sôro anti-693 ⋈ ⋈ anti-693.

## SEROLOGICAL SPECIFICITY OF SULPHANILAMIDIC AZO-PROTEINS.


### *Abstract*

*1) The serological specificity of the following compounds has been studied: Sulphanilamide (1162 compound), sulphapyridine (693 compound), Uliron (Bayer), sulphanilic acid and atoxyl.*

*2) Artificial complex antigens have been prepared by diazotization of the above cited compounds and subsequent copulation with serum proteins of horse and sheep.*

*3) The serums of rabbits immunized with the complex antigens prepared with horse serum protein were tried with complex antigens prepared with sheep serum protein in order to avoid species specific reactions. The precipitation and inhibition tests were performed in the usual manner.*

*4) The experiments have shown that the studied compounds could be separated in two groups, the first one comprising the compounds 1162 and 693 and the second one comprising Uliron, sulphanilic acid*

*and atoxyl. The azo-antigens prepared with the compounds of the first group present crossed reactions, showing only an incomplete serological specificity. The compounds of the second group, however, did not react with rabbit anti-serum against complex antigens prepared with the two haptens of the first group.*

## BIBLIOGRAFIA


1 — Erlenmeyer, H. und E. Berger — 1934 — Ueber immunchemische Untersuchungen in der Pyrazolon-Reihe. *Arch. f. exp. Pathol. und Pharmak.*, **177,** 116-118.

2 — Kossovitch, N. et Ch. Adra — 1939 — Spécificité sérologique des dérivés arsénicaux des groupes orsanine et stovarsol. *Rev. d'Immunol.,* **5,** 272-278.

3 — Landsteiner, K. — 1936 — The specificity of serological reactions. Charles C. Thomas, Baltimore.

4 — Marrack, J. R. — 1938 — The chemistry of antigen and antiboides. *Medical Res. Council.* London.

5 — Mingoja, Q. — 1938 — Derivados hydrosoluveis da p. aminophenylsulfamida. *Arquivos de Biologia,* S. Paulo, n.º 203,25.

6 — Obermayer, F. und E. Pick — 1906 — Ueber die chemischen Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweisskoerper-Bildung von Immunpraezipitinen durch chemisch veraendert Eiweisskoerper. *Wiener Klin. Woch.*, 327.

Vol. 10 — Art. 17

Dezembro de 1939

# SAWAYAELLA POLYZOORUM, GEN. NOV., SPEC. NOV. DOS SCHIZOGREGARINARIA

POR

E. Marcus

Do Departamento de Zoologia da Universidade de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampas 32-33

## INTRODUÇÃO

O parasita foi descoberto por minha esposa, Exma. Snra. D. ÉVELINE DU BOIS-REYMOND MARCUS, no trato intestinal de certas espécies de Bryozoa (Polyzoa) marinhos (veja p. 264). Foi estudado por mim conjuntamente com minha esposa e denominado em honra do meu amigo Dr. P. SAWAYA, professor de Fisiologia geral e animal da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo.

### I. NOÇÕES GERAIS SOBRE AS ESQUIZOGREGARINAS

A grande maioria das espécies da ordem Gregarinida, considerada por WENYON (1926, p. 1117) como subclasse e chamada então Gregarinina, multiplica-se sómente por gametos, cuja união resulta num zigoto que, por sua vez, tornando-se esporoblasto, dá origem aos esporozoitos. Em alguns poucos gêneros, porém, ocorre, antes da reprodução descrita, outra ainda, que se realiza na forma de uma divisão repetida. Por tal divisão progâmica, a esquizogonia, distingue-se a subordem Schizogregarinaria LÉGER 1900 (ordem Schizogregarinida na terminologia de WENYON 1926, p. 1118, 1125) das Gregarinas restantes ou Eugregarinaria LÉGER 1900. *Sawayaella polyzoorum* pertence aos Schizogregarinaria. Com FANTHAM (1908, p. 411-412) e DOFLEIN (DOFLEIN-REICHENOW 1929, p. 863) podemos chamar a esquizogonia uma reprodução endogênica e multiplicativa respectivamente, porque resulta em reinfecção do hospedador e em multiplicação do parasita. A esporogonia foi chamada reprodução exogênica ou propagativa, porque resulta na infecção de novos hospedadores, espalhando assim o parasita. Além da esquizogonia a sub-ordem não possue caracteres comuns. Não ha dúvida que as Esquizogregarinas pertencem às Gregarinas (MINCHIN 1903, p. 191), mas cada sistematização dos varios gêneros abrangidos pela sub-ordem Schizogregarinaria é tão dificil que KEILIN (1923 a), segundo WENYON (1926, p. 1126), e KUDO (1931, p. 299) a isso renunciam. KEILIN admite até a possibilidade de terem adquirido Eugregarinaria diferentes, secundariamente, a capacidade de esquizogonia. En-

tre outros, LÉGER (1900), Brasil (1907, p. 387-388), LÉGER & DUBOSCQ (1908, p. 100) e HARTMANN (1923, p. 226, 230-231) consideram as Esquizogregarinas, ao contrario, como unidade sistemática natural. Os gêneros de organização simples, como *Selenidium* e *Schizocystis,* são tidos por HARTMANN como formas primitivas, das quais tanto os Schizogregarinaria mais complicados, quanto os Eugregarinaria e os Coccidiomorpha, filogeneticamente poderiam ser derivados. Por mais compreensivel que seja a tentativa de estabelecer uma certa ordem dentro dos Telosporidia, sem dúvida mutuamente relacionados, a diversidade das Esquizogregarinas adultas (trofozoitos, fases vegetativas) fala, ao meu vêr, mais em favor da opinião de KEILIN. Para fins sistemáticos a sub-ordem certamente pode ser dividida em Monosporidea e Polysporidea (LÉGER & DUBOSCQ 1908, p. 101), cujos caracteres são mencionados na tabela seguinte (veja p. 261). A separação dos Ectoschiza e Entoschiza, proposta por FANTHAM (l. c.), segundo a realização extra ou intracelular da esquizogonia, não pode ser mantida, porque no gênero *Menzbieria* ambos os tipos ocorrem (WENYON 1926, p. 1127, 1132, 1134; DOFLEIN-REICHENOW 1929, p. 876).

Desde a publicação concisa de HARTMANN (1923, p. 219-231) sobre os Gregarinida, o conteudo da sub-ordem Schizogregarinaria sofreu alterações consideráveis. Tal flutuação mostra a dificuldade de circunscrever uma unidade taxonómica, que pela esquizogonia se aproxima dos Coccidia, ao passo que a gametogonia e esporogonia concordam com as dos outros Gregarinida. Dos gêneros mencionados por HARTMANN como pertencentes aos Schizogregarinaria, foi *Selenococcidium,* que pareceu reunir caracteres dos Coccidia e Schizogregarinaria (LÉGER & DUBOSCQ 1910, p. 209-215), removido à ordem Coccidia, por causa dos seus anisogametos. Aí representa família especial da subordem Eimeriidea (WENYON 1926, p. 801). *Porospora* (SCHNEIDER 1875, p. 585) tambem não mais se conta entre os Schizogregarinaria. Considera-se hoje como pertencente aos Eugregarinaria do grupo dos Cephalina (Polycystidea), onde, conjuntamente com *Nematopsis* A. SCHNEIDER 1892, forma uma família separada (REICHENOW 1932, p. 36-37). A fase tida anteriormente como esquizogonia no intestino dos Crustacea passa hoje por gametogonia, dando-se verosimilmente a copulação dos gametos e assim a formação do zigoto nas brânquias de Mollusca (DOFLEIN-REICHENOW 1929, p. 896; REICHENOW 1932, p. 36).

Dos tres gêneros por REICHENOW (1932, p. 25-27) anexos às Esquizogregarinas, mas, naquele tempo imperfeitamente conhecidos quanto à multiplicação, dois, a saber: *Siedleckia* CAULLERY & MESNIL 1898 (em parte) e *Eleutheroschizon* BRASIL 1906, foram recentemente excluidos dos Schizogregarinaria, por se acharem desprovidos de esquizogonia

(Chatton & Villeneuve 1936). Caso pesquisas ulteriores provassem a ocorrência de esquizogonia em espécies do gênero *Siedleckia*, êstes parasitas alongados e, quando adultos, multinucleares, não poderiam ser confundidos com *Sawayaella*.

Ao lado das eliminações enumeradas, houve acrescimo de gêneros das Esquizogregarinas pelas descrições dos quatro gêneros seguintes: *Mattesia* (Naville 1930), *Meroselenidium* (Mackinnon & Ray 1933), *Machadoella* (Reichenow 1934), *Lipocystis* (Grell 1938). Incluindo *Sawayaella*, seria assim possivel resumir o conteúdo atual da sub-ordem Schizogregarinaria em uma chave, que visa unicamente facilitar a determinação e em nada pretende ser um novo sistema do grupo.

1. Da união de dois gametocitos (gamontos) resulta um unico oocisto (esporocisto, esporo) (Monosporidea Lég. & Dub., 1908) . . . . . . . . . 2
   Da união de dois gametocitos resultam mais que um oocisto (Polysporidea Lég. & Dub., 1908) . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 4
2. Trofozoitos adultos enrolados em forma de caracol chato . . . . . . . *Spirocystis* Léger & Duboscq, 1911.
   Trofozoitos adultos alongados ou arredondados, não enrolados . . . . 3
3. Trofozoito pegado à celula do hospedador por meio de processos pseudopodoides . . . . . . . . . . . . . . . *Ophryocystis* A. Schneider, 1883.
   Trofozoito aderente à celula do hospedador por meio de um epimerito . . *Merogregarina* Porter, 1908.
4. Cada gametocito (gamonto) fornece dois gametos, originando-se assim no total dois oocistos (esporos) no mesmo gametocisto . . . . . . . . . . *Mattesia* Naville, 1930.
   O número dos gametos oriundos de cada gamonto e assim o número total dos oocistos no mesmo gametocisto é superior a dois . . . . . . . . 5
5. Os oocistos (esporocistos, esporos) são aculeados, possuindo em cada um dos dois polos 3-4 espinhos . . . . . . . *Syncystis* A. Schneider, 1886.
   Os oocistos são desprovidos de espinhos . . . . . . . . . . . . . . 6
6. Os trofozoitos são esbeltos, vermiformes e longitudinal ou obliquamente estriados . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 7
   Os trofozoitos são alongados ou arredondados, porém sem estriatura longitudinal ou obliqua . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 10
7. Trofozoitos rígidos, fortemente cuticulados, não se encurvam, nem torcem; são providos de costellas longitudinais . . . *Machadoella* Reichenow, 1934.
   Trofozoitos flexíveis, encurvam-se e torcem-se vivamente; são providos de mionemas situados no fundo de sulcos longitudinais ou obliquos . . . 8
8. Trofozoitos adultos multinucleados . . . *Siedleckia* Caullery & Mesnil, 1898 (esquizogonia ainda não verificada).
   Trofozoitos adultos uninucleados . . . . . . . . . . . . . . . . . . 9
9. Na esquizogonia precede a divisão nuclear à plasmatica . . . . . . . . *Selenidium* Giard, 1884.
   Na esquizogonia o esquizonto divide-se em cerca de 8-10 citómeros, cujas superfícies depois se cobrem com núcleos . . . . . . . . . . . . . . *Meroselenidium* Mackinnon & Ray, 1933.

10. Dois tipos de esquizogonia ocorrem, resultando a intracelular em merozoitos alongados, a extracelular em amibóides . . . . . . . . . . . . . . .
*Menzbieria* BOGOYAVLENSKY, 1922.
Da esquizogonia, que pode realizar-se intra ou extracelularmente, resultam merozoitos de um só tipo . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 11
11. Os esquizontos e trofozoitos são alongados . . *Schizocystis* LÉGER, 1900.
Os esquizontos são globulares . . . . . . . . . . . . . . . . . . 12
12. No máximo 16 oocistos (esporocistos, esporos) originados em um gametocisto (sizigiocisto) . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 13
No mínimo 100 e até 1.000 oocistos originados em um gametocisto . . . 14
13. O trofozoito adulto tem um pseudomerito; oocistos em número de 8-11 . . .
*Caulleryella* KEILIN, 1914.
O trofozoito é desprovido de pseudomerito; oocistos em número de 16 . . .
*Lipotropha* KEILIN, 1923.
14. Duas fases agámicas, uma primeira de pequenos núcleos e uma segunda de grandes núcleos . . . . . . . . . . . . . *Lipocystis* GRELL, 1938.
Sómente uma fase agámica . . . . . . . . . . . *Sawayaella*, gen. nov.

Quanto ao hospedador do novo gênero, os Bryozoa marinhos mencionados a seguir, sinto-me autorizado para afirmar que o parasita aqui apresentado ainda não foi descrito. Não posso, por outro lado, verificar terminantemente, se a sub-ordem Schizogregarinaria contem sómente os 15 gêneros: *Caulleryella, Joyeuxella, Lipotropha, Lipocystis, Machadoella, Mattesia, Menzbieria, Merogregarina, Meroselenidium, Ophryocystis, Schizocystis, Selenidium, Siedleckia* (posição dubia), *Spirocystis* e *Syncystis*. Resulta tal incerteza da impossibilidade de rever a literatura inteira acerca dos Gregarinida. Realmente deveria ser consultada, visto que a resenha bibliograficamente mais completa, o «Zoological Record», não distingue na sua parte sistemática, como o fazem os «Biological Abstracts», Schizo e Eugregarinaria.

Na tabela falta o gênero *Joyeuxella* (BRASIL 1902), cuja esporogonia se ignora. Os seus trofozoitos falcatos e, nas duas extremidades, cuspidatos, são nitidamente diferentes dos de *Sawayaella*. Tão pouco foi possivel incluir na chave de classificação o gênero *Piridium* (PATTEN 1936), talvez aproximado ao gên. *Spirocystis* (PATTEN, l. c., p. 514), mas ainda de posição incerta. As estruturas semelhantes a um blefaroplasto (p. 509, f. 13) tornam o parasita mencionado do caracol marinho *Buccinum* (Gastropoda, Prosobranchia) inconfundivel com *Sawayaella*.

Os gêneros dos Schizogregarinaria que habitam hospedadores marinhos são: *Joyeuxella* em *Lagis koreni* MALMGR. (Polychaeta), *Merogregarina* em *Amaroucium*-spec. (Ascidiacea), *Meroselenidium* em Polychaeta, *Schizocystis* em Sipunculoidea (DOGIEL 1907) e *Selenidium* em Nemertini (Awerinzew 1909), Polychaeta, assim tambem verificado no litoral brasileiro (FARIA, CUNHA & FONSECA 1917; HASSELMANN 1926),

em Sipunculoidea e em *Glossobalanus minutus* Kow. (Enteropneusta, Helminthomorpha). Como os demais Schizogregarinaria marinhos, é tambem *Sawayaella* um parasita intestinal, habitando o intestino médio de varias espécies do gênero *Thalamoporella* Hincks 1887 (Bryozoa, Gymnolaemata Cheilostomata anasca) e, mais raramente, de *Watersipora cucullata* (Busk 1854) (Bryozoa, Gymnol. Cheil. ascophora).

Sobre o efeito patogênico das Esquizogregarinas não é possivel formar um juizo geral. Evidentemente são diversos os efeitos causados pelas varias espécies. Ou as larvas de *Cellia* infectadas por *Caulleryella maligna,* morrem ou, se conseguem metamorfosear-se, morrem os mosquitos adultos (Godoy & Pinto 1922, p. 47). Por outro lado diz Reichenow (1932, p. 20): «os Telosporidia», quer dizer, Gregarinida e Coccidia, «dos animais marinhos são quasi todos completamente inócuos para os seus hospedadores, mesmo quando ocorrem em massa». As excepções aludidas por Reichenow não se referem a representantes dos Schizogregarinida. Ajusta-se à opinião citada o quadro de infecção apresentado por *Sawayaella polyzoorum.* Nas colonias infestadas o número dos polipídios degenerados («corpos brunos», veja estes Arquivos, vol. 7, p. 205, Fig. 4) não ultrapassa o dos zoários isentos de parasitas, e a espermatogenese dos indivíduos, cujo intestino médio contem mesmo grandes quantidades de parasitas, acha-se em estado normal. Bloqueio do lumen intestinal, como foi observado na ascídia colonial *Amaroucium,* infestada por *Merogregarina amaroucii* (Porter 1908, p. XLIV), não se notou no material presente. Talvez não seja absolutamente definitiva a opinião de ser indiferente a infecção provocada por *Sawayaella.* Baseia-se tal juizo na observação do intestino sobrevivente isolado, em esfregaços do conteúdo intestinal e em 250 séries de cortes e preparações totais. Falta ainda a experimentação da infecção artificial e a criação dos Bryozoa infestados. Nas primeiras tentativas verificámos novamente o fato, conhecido, de serem os Bryozoa marinhos, com raras excepções pouco resistentes à vida em aquário. A destruição causada pelas fases intracelulares do parasita restringe-se geralmente às partes distais das células epiteliais do intestino, permanecendo muitas vezes ilesa a base das células, e sempre não alterada a musculatura e esplanchnopleura. Naturalmente as células infestadas não poderão exercer a sua normal função digestiva, mas como os Bryozoa são muito vorazes e digerem rápida e incompletamente, a eliminação temporária mesmo de células intestinais relativamente numerosas, ao que parece não lhes é perniciosa. Por outro lado, não foi observada hipertrofia das células vizinhas às infestadas, como se verificou na ascídia acima mencionada (Porter 1908, p. XLVI), infestada por *Merogregarina.* Léger (1907, p. 165) observou tambem hipertrofia das cé-

lulas dos vasos de Malpighi de Coleoptera infestados por *Ophryocystis,* mas tal hipertrofia pode ser seguida por atrofia. A Snra. PORTER fala em estimulação das células adjacentes ás em que um merozoito ou um esporozoito penetra. Talvez possa estimulação semelhante explicar o resultado estranho obtido recentemente por RUTH SUMNER (1936), cujas culturas de larvas de *Tenebrio molitor* («bichos de farinha») infestadas por Eugregarinaria manifestavam crescimento mais rápido e mortalidade menor que as larvas não parasitadas. Não é da minha competência discutir o fenómeno de ser beneficiado o hospedador pelo parasita que, no caso citado, se tornaria simbionte. As fases adultas dos escaravelhos não oferecem, pelo que sei, exemplos semelhantes. As Gregarinas intestinais são geralmente consideradas como indiferentes para os Coleoptera hospedadores (v. LENGERKEN 1924, p. 36), causando, por outro lado, a infecção de Eugregarinaria celomáticos, quando em grandes quantidades, castração e até a morte de *Carabus nemoralis* (DELKESKAMP 1930, p. 19, 56). Ocorrem justamente nas Gregarinas dos Coleoptera, p. e., no gênero *Pyxinia* (*), epimeritos que penetram na célula do hospedador até a membrana basal, de maneira que se tornam quasi ineficazes contra tal aparelho de fixação os meios de defesa do epitélio infestado, discutidos por LÉGER & DUBOSCQ (1902, p. 463-465).

## II. DESCRIÇÃO DE *Sawayaella polyzoorum,* GEN. NOV., SPEC. NOV.

### 1. O gênero *Sawayaella* e seus hospedadores.

Pertence aos Schizogregarinaria Polysporea. Vive no intestino médio de Bryozoa (Polyzoa) marinhos, onde até agora foi verificada em espécies dos gêneros *Thalamoporella* HINCKS 1887 e *Watersipora* NEVIANI 1895. O trofozoito esférico é provido de pseudomerito curto. A esquizogonia realiza-se extracelularmente. Da gametogonia e esporogonia que se dão dentro de um gametocisto, resultam mais de 100 e até cerca de 1.000 oocistos. Cada oocisto contem 8 esporozoitos.

Apezar de pertencerem os hospedeiros sobreditos a secções diferentes da sub-ordem Cheilostomata, a saber, aos Anasca e Ascophora, respetivamente, parece existir certa especificidade do parasita, porque, nas Florideáceas incrustadas por *Thalamoporella evelinae* MARC., crescem tambem outras espécies, p. e., *Electra bellula* (HCKS.) (Cheilostomata Anasca), *Siniopelta diota* MARC. (Cheilostomata Ascophora) e *Zoobotryon pellucidum* EHRBG. (Ctenostomata), todas elas em Junho de 1939 isentas de parasitas. Por outro lado, não parece haver perio-

(*) Agradeço ao Snr. Prof. Dr. A. Carini a gentileza de me haver ocasionado conhecimento dos trofozoitos muito singulares de *Pyxinia crystalligera* FRNZ. entregando-me boas láminas com esfregaços e cortes do intestino de *Dermestes peruvianus* para o fim da classificação do parasita.

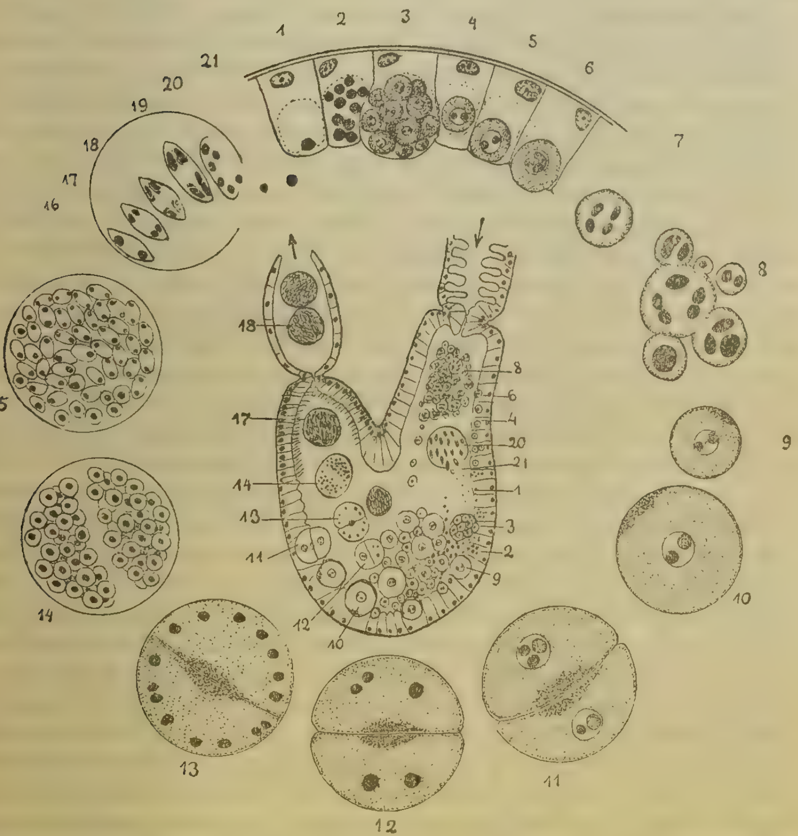


Fig. 1 — *Sawayaella polyzoorum*, esquema do ciclo evolutivo. *1*, esporozoitos. *2-5*, crescimento de um ou vários esporozoitos no vacúolo da célula do epitélio cecal. *6*, emigração do esquizonto. *7-8*, esquizogonia. *9*, trofozoito. *10*, gamonto. *11*, sizigia. *12-13*, gametogonia. *14*, gametos no gametocisto. *15*, zigotos, em parte já se tornando esporoblastos. *16-19*, esporogonia. *20*, oocisto cujos esporozoitos *(21)*, emigram. *9-18*, podem realizar-se intra e extra-celularmente. No centro: esófago, ceco e reto de *Thalamoporella* (Bryozoa Cheilostomata anasca) com os vários estados do parasita.

dicidade na aparência de *Sawayaella polyzoorum*, porque as colônias examinadas no inverno (Junho) de 1939 não foram menos infestadas que as estivais do Janeiro de 1938 e 1939.

## 2. Morfologia e ciclo evolutivo de *Sawayaella polyzoorum*

Normalmente, dá-se a infecção de um polipídio dos Bryozoa acima mencionados pela deglutição de gametocistos totais. Frequentemente

se encontram 2-6 gametocistos maduros no reto (proctodeo, BORG 1926, p. 219) de indivíduos infestados, mostrando outros polipídios muitas vezes gametocistos com oocistos algo inchados na região da cárdia (jejunum, BORG l. c.) ou no ceco (Fig. 1, *20*). Êstes casos, observados com regularidade bastante pronunciada, tornam muito verosimil serem os gametocistos inteiros engulidos pelo Bryozoário. Não se pode negar, é claro, a possibilidade da infecção por oocistos isolados, porque os gametocistos se acham sujeitos a vários processos que poderiam causar o seu arrebentamento prematuro e, assim, a libertação dos oocistos contidos nos gametocistos. Tais processos são a incorporação dos gametocistos cheios de oocistos no corpo bruno, a defecação e a passagem dos gametocistos pelo mar. Casos de fraca infecção, que ás vezes foram observados, explicam-se de modo mais simples, quando considerados como provenientes de um único oocisto engulido. Ao se dissolver o gametocisto na entrada do ceco, os oocistos rompem-se e os esporozoitos se tornam livres. O número estimativo dos esporozoitos oriundos de um gametocisto engulido pelo hospedador seria de 800-8.000.

Até agora as espécies do gênero *Lipotropha* KEILIN foram consideradas como os mínimos representantes dos Schizogregarinaria e dos Gregarinida em geral (WENYON 1926, p. 1125), medindo os oocistos de *Lipotropha microspora* $8 \times 3\,\mu$. As dimensões dos oocistos de *Sawayaella polyzoorum* são muito menores. Apesar de serem uniformes os oocistos do novo parasita, variam consideravelmente, como se evidencia pelas medidas seguintes, tomadas no hospedador primordial, antes da passagem pelo mar, cuja duração diferente e inchamento correspondente variavel poderiam redundar em variação ulterior. Oocistos medidos nas regiões pilórica e retal do hospedador originário variam entre os extremos de $3{,}6 \times 0{,}8$ e $5{,}5 \times 1{,}7\,\mu$. Os 8 esporozoitos que sáem de oocistos tão pequenos apresentam-se nos córtes, mesmo com a imersão de 120 vezes de aumento, sómente como pontinhos de ca. $1\,\mu$ de diâmetro.

Os esporozoitos podem permanecer no lumen cecal ou entrar no epitélio do intestino médio (estampa 32, fig. *B*). Nem os córtes nem os esfregaços do material vivo permitem decidir, se os esporozoitos atravessam ativamente a orla das células intestinais ou se são fagocitados. Considera-se como fagocitose a incorporação de partículas maiores que $0{,}1\,\mu$ nas células respetivas (JORDAN & HIRSCH 1927, p. 25). Nega-se a ocorrência normal de fagocitose nos Phylactolaemata (BECKER 1937, p. 108), mas foi observada, quando foram introduzidas substâncias artificiais, como, por exemplo, nanquim, carmin, grânulos de melanina etc., no intestino de *Zoobotryon pellucidum* Ehrbg., representante dos Gymnolaemata (RIES 1936, p. 72 e seg.). O problema da fagocitose

nos Bryozoa ainda se acha aberto. W. v. BUDDENBROCK (1928, p. 593, nota) nega haver fagocitose nêste grupo, e de fato tal processo não parece verosimil em células de orla livre fortificada (ibid., p. 594). Por outro lado, a entrada de cascas de Diatomáceas nas células epiteliais do intestino não é rara nos materiais vistos por nós (estampa 33, fig. *K,d)*, salientando RIES (1936, p. 81) justamente o contrário do seu objeto, *Zoobotryon*. Em toda fagocitose trata-se, ao lado do mecânico, tambem de um processo químico. As figuras instrutivas de HATT (1927, p. 3) mostram incorporação dos esporos de *Porospora gigantea* pelo epitélio do pé e das brânquias de *Mytilus*, em consequência de um estímulo específico exercido sobre o tecido. Êste último acha-se, nas regiões aludidas do mexilhão, provido de cílios basalmente ligados por orla cuticular, seguindo mais para dentro os grânulos basais dos cílios.

Em oposição ao número enorme de esporozoitos libertados quasi simultaneamente pela decomposição de um gametocisto cheio de oocistos, não é tão grande a quantidade de trofozoitos em fase absolutamente igual de crescimento. Evidencia-se assim que os trofozoitos se engrandecem com rapidez diferente. Embora seja um tanto estranho o fato, afirmamos que os trofozoitos podem crescer intra e extracelularmente. Quando intracelulares, um ou vários esporozoitos podem infectar uma única célula intestinal. Abstraindo a diferença entre as células de secreção e de resorpção, que se nota no ceco dos Bryozoa, podemos distinguir zonas diferentes dentro das células cecais. A orla celular livre tinge-se fortemente, por ser mais densa que a maior parte do corpo restante da célula. São compostas por plasma denso tambem as zonas periférica e basal, contendo a última, geralmente, o núcleo (estampa 32, figs. *A, B*). No centro encontra-se uma zona menos viscosa, às vezes quasi hialina, e aí se acham os trofozoitos. O trofozoito em crescimento é esférico (est. 32, figs. *C, D*), notando-se no seu núcleo vesiculoso dois cariosomas, um acidófilo, vermelho nos córtes corados com hematoxilina-eosina-orange, e outro basófilo, azul na coloração descrita. Dois cariosomas, um vermelho e um azul, são conhecidos de varios Monocystidea (Eugregarinaria, Acephalinidea), mencionando-os entre outros, por exemplo E. HESSE (1909, p. 208-209 t. 7 f. 183, 187). O aspecto arredondado dos trofozoitos e gamontos de *Sawayaella polyzoorum*, característico dos animais vivos e fixados, lembra o da *Lipotropha macrospora* figurada por KEILIN (1923 a) (WENYON 1926, f. 471, 1). Merozoitos e esquizontos esféricos ocorrem tambem em *Syncystis mirabilis* A. SCHNEIDER (STEOPOE 1928). O ectoplasma das fases vegetativas de *Sawayaella* é homogeneo e denso, o endoplasma, granuloso. O grande núcleo é ordinariamente vesicular, notando-se as vezes certa

irradiação, saindo do núcleo (est. 32, fig. *A, x*). Nas fases vegetativas o cariosoma vermelho é menor e mais escuro que o azul maior e mais pálido. Nos trofozoitos e gamontos vivos o núcleo é ligeiramente avermelhado, distinguindo-se pontinhos refringentes em redor da membrana nuclear.

Crescimento do cariosoma azul caracteriza os trofozoitos que se tornam esquizontos (est. 32, figs. *E, F*). Com diâmetro de 5-7 μ, portanto, no fim de período relativamente curto de crescimento, os trofozoitos intracelulares abandonam a célula hospedadora (est. 32, figs. *E, F*). E' provavel, se bem que não demonstravel, que trofozoitos que permaneçam no lumen intestinal possam igualmente dividir-se agamicamente, visto que se encontram trofozoitos de todos os tamanhos no lumen cecal.

A esquizogonia realiza-se sempre extracelularmente e com preferência na região cardíaca do ceco. Desaparecendo a membrana nuclear e o cariosoma vermelho, a esquizogonia apresenta-se como fragmentação do núcleo e do protoplasma do esquizonto, que saído com diâmetro de 5-7 μ da célula intestinal, atinge no lumen da cárdia diâmetro de cerca de 15 μ. As formas de alteres e de linguiças exibidas pelos núcleos fazem presumir que a divisão do núcleo se processe por criptomitoses rapidamente repetidas (est. 32, fig. *F*). Continúa evidentemente nos merozoitos globulosos, no inicio multinucleados, a divisão, até resultarem merozoitos uninucleados. Êstes não são tão pequenos como os esporozoitos e permitem distinguir-se nêles plasma e núcleo. A esquizogonia de *Machadoella triatomae* (Reichenow 1935, t. 10 f. 14-17) assemelha-se, de certo modo, à de *Sawayaella.*

A ocorrência extracelular e o aspecto do núcleo tornam inconfundíveis as fases da esquizogonia e os casos de multi-infecção de uma única célula da parede do ceco. Em tais casos a célula respetiva acha-se enormemente dilatada. Salienta-se então para dentro do lumen do intestino o vacúolo celular central, repleto de trofozoitos e circundado por ténue manto protoplasmatico (est. 32, fig. *G*). Naturalmente permanecem os trofozoitos crescentes e acumulados na mesma célula individualmente isolados. Contrasta assim a aparência das multi-infecções profundamente com a do brotamento dos merozoitos na esquizogonia.

A existência de fases vegetativas (trofozoitos ou simplesmente «gregarinas») dentro e fóra das células mostra ser o parasita capaz de se alimentar tanto das substâncias dissolvidas pelos sucos digestivos do Briozoário no lumen intestinal como das resorbidas pelas células intestinais. Subtraindo alimento ao hospedador, sem, porém, viver da propria substância do corpo da célula, *Sawayaella polyzoorum* revela-se antes comensal do que parasita verdadeiro. Mas visto não haver meios

para discriminar rigorosamente todas as relações mútuas entre os membros de uma biocenose e se ignorar a influência do metabolismo da Gregarina sobre o Briozoário, a denominação de parasita parece por enquanto irrepreensivel.

Quasi sempre os trofozoitos vivos e fixados têm forma esférica (estampa 33, fig. *H*), por se achar retraido o curto processo, o pseudomerito (estampa 32, fig. *G*, est. 33, fig. *H, p*), que raramente se salienta como um cône de protoplasma denso. O termo «pseudomerito» foi introduzido por Bresslau (Bresslau & Buschkiel 1919, p. 329) para designar apéndice formado pelo endoplasma, envolvido pelo ectoplasma, porém não separado do corpo restante por lamela ectoplasmática. O endoplasma do pseudomerito de *Sawayaella* é mais homogêneo que o das outras partes do trofozoito, onde se nota sempre certa granulosidade. Nunca vimos o pseudomerito em função de orgânulo adesivo, como foi observado pela Snra. Buschkiel (1921, f. A-C, t. 4 f. 1), nem no intestino sobrevivente, ainda com batimento dos cílios, nem nos córtes. Em *Machadoella spinigeri* tambem não foi vista fixação do parasita às células das paredes intestinais (Machado 1913, p. 6).

Podendo o parasita percorrer o seu ciclo evolutivo extracelularmente no intestino médio dos Briozoários sobreditos, não precisa pegar-se à célula do hospedador para garantir a sua alimentação. Muito mais dificil seria explicar como os trofozoitos conseguem permanecer no fundo do ceco, sem que sejam fixados na parede intestinal. O aspeto da Fig. 1 não é exageradamente esquematisado quanto à disposição topográfica das varias fases que mantêm, com excepções relativamente raras, a ordem desenhada. Movimento ativo dos trofozoitos não foi observado por nós, apesar de termos dedicado atenção especial a êste fenómeno. Em esfregaços examinados contínua e demoradamente no microscópio, como tambem em outros, onde marcámos os lugares inicialmente ocupados pelos trofozoitos, para podermos verificar locomoção eventual, o resultado foi invariavelmente negativo. Nos intestinos sobreviventes depois de terem sido isolados, impedem os cílios especialmente ativos no teto do ceco, como tambem os movimentos peristálticos, vigiar o observador um determinado trofozoito durante muito tempo. Mas, em todo o caso, podemos afirmar que não houve locomoção própria dos trofozoitos durante os intervalos entre duas contrações peristálticas, e em pontos protegidos contra as correntes provocadas pelos cílios. Por mais precária que seja uma afirmação negativa, consideramo-nos, depois das observações descritas, autorisados à opinião de serem imóveis os trofozoitos de *Sawayaella polyzoorum*. Tal fato não é isolado entre os Schizogregarinaria; tem, p. e., sido assinalado por Léger & Hagenmüller (1900, p. XLIII) em *Ophryocystis schneideri*

e por Reichenow (1935, p. 436) em *Machadoella triatomae*. Não havendo locomoção do parasita, devemos responsabilizar o movimento do intestino, talvez influenciado pelo quimismo do parasita, pela régra observada de se encontrarem as fases da esquizogonia preferivelmente na região cardíaca e as fases ulteriores, como p. e., os trofozoitos adultos, a gametogonia etc., especialmente no fundo cecal.

Os gamontos reunem-se e se encistam tanto intra como extracelularmente (est. 33, figs. *I, K*). Gametocistos intracelulares são mais raros que os livres no lumen do ceco. Não foi possivel, até agora, decidir qual a antecedência dos gamontos intracelulares. Poderiam ser descendentes de merozoitos, i. é, produtos da esquizogonia e depois novamente incorporados pelas células intestinais, correspondendo tal suposição ao esquema geral do ciclo evolutivo de uma esquizogregarina, i. é, de um protozoário, cujo desenvolvimento percorre duas fases: a primeira multiplicativa ou esquizogônica e a segunda propagativa ou gametogônica, seguida pela esporogonia. Hesitamos, porém, em considerar todos os gametocistos intracelulares como associações de descendentes de merozoitos. Poderiam tambem ter a origem de esporozoitos que cresceram intracelularmente e se tornaram trofozoitos adultos (gamontos), sem que tivessem passado pela fase multiplicativa. Leva-nos a tal ideia o fato de não serem tão frequentes as esquizogonias, como se deveria esperar, se todos os esporozoitos algo crescidos passassem normalmente por esta fase. Não como afirmação definitiva, mas como opinião fundamentada por numerosas contagens, publicamos que, ao nosso vêr, é facultativa a esquizogonia em *Sawayaella polyzoorum*. Ha outros gêneros dos Schizogregarinaria em que foi observada raridade da esquizogonia em comparação com a gametogonia, a saber, *Schizocystis sipunculi* (Dogiel 1907, p. 208) e *Machadoella spinigeri* (Machado 1913, p. 6).

Além disso devemos inevitavelmente adoptar a opinião de se processar eliminação consideravel dos parasitas até chegarem à gametogonia. Se todos os esporozoitos libertados de um gametocisto e dos seus, no mínimo, 100 oocistos, se tornassem gamontos, mesmo sem esquizogonia, o número dos gamontos deveria ser muito maior do que realmente é. A rapidez diferente com que os vários esporozoitos percorrem a sua evolução, conforme as condições heterogêneas nutritivas que encontram no lumen do ceco e nas células infestadas por um ou muitos parasitas, não explica o fenómeno comum de uma desproporção entre 800 esporozoitos, no mínimo, e algumas dezenas de trofozoitos adultos. Todas as fases extracelulares de *Sawayaella* encontram-se no lumen do ceco em meio muito agitado pelos fortes movimentos peristálticos. Desprovidas de orgânulos adesivos às paredes, essas fases

serão provavelmente muitas vezes eliminadas com as fezes. Esquizontos no estado do brotamento dos merozoitos encontram-se, como foi dito, normalmente na região da cárdia; pudemos verificá-los, porém, em vários casos entre a corôa dos tentáculos, para onde somente podem ser transportados por movimentos antiperistálticos do intestino anterior. Apesar de não provocar o parasita a degeneração do intestino, será, em muitos casos, efetuada a infecção de um intestino que daí a pouco vai degenerar. Sendo assim, todas as fases do parasita, excéto os oocistos maduros, hão de perecer. Tais «corpos brunos» evidentemente recem-infestados foram observados por nós, como tambem outros em que predominaram as fases propagativas, i. é, de esporogonia. Em *Thalamoporella* e em *Watersipora* os «corpos brunos» são eliminados do zoécio pelo processo conhecido de incorporação da massa degenerada pelo botão regenerativo, o qual assim poderia pôr em liberdade os oocistos que amadureceram no intestino precedente.

Os gamontos ou gametocitos associam-se de tal maneira que as zonas correspondentes aos pseudomeritos involuidos, se tornam contiguas, concordando por isso a região central dos gamontos quanto à densidade e à tingibilidade, perfeitamente, com a calota irregular que geralmente indica o lugar do pseudomerito retraido dos esféricos trofozoitos adultos. A nossa interpretação do centro de contato dos dois gamontos como homólogo aos pseudomeritos antigos corresponde à dada por Wenyon (1926, p. 1123) em *Lankesteria culicis*. Zonas lenticulares semelhantes nas «sizigias» de *Caulleryella pipientis* são, ao que parece, independentes dos pseudomeritos (Buschkiel 1921, p. 116). Wenyon (1926, p. 1142) ainda reserva o termo «sizigia» para as associações dos trofozoitos livres em forma de cadeia ou ramificação, muitas vezes passageiras, mas na literatura mais recente nota-se certa tendência para chamar de «sizigia» tambem á reunião definitiva dos gamontos, cujos prelúdios seriam as cadeias aludidas (Reichenow 1932, p. 27).

O diâmetro dos gametocitos pode atingir 30 $\mu$; são, porém, de volume muito diferente, quando se associam aos pares e se encistam. Assim os gametocistos, cujos dois parceiros se aplainam nas calotas de contato (est. 33, fig. *I*), variam de 16 a 40 $\mu$ em largura e 20 a 50 $\mu$ em longura. Os dois gamontos que se reunem podem ser de tamanho bastante desigual. O envólucro do gametocisto, quando começa a aparecer, é muito fino. No início da gametogonia (fig. *I*) duplica-se o cariosoma vermelho, empalidecendo o azul, até sumir completamente. As mitoses seguintes nem sempre se realizam em rítmo igual nos dois parceiros, de maneira que pode haver diferença consideravel das fases. Divisão não contemporânea foi assinalada tambem na gametogonia de *Selenidium mesnili* (Reed 1933, p. 404, t. 25 f. 9, t. 26 f. 10, 11). Os

gamontos ainda se mantêm individualmente separados em *Sawayaella* quando já estão formados numerosos núcleos. Enquanto os parceiros continuam isolados, destacam-se ainda as zonas dos pseudomeritos passados (est. 33, figs. *K, L*). Os núcleos dos gametos presuntivos tingem-se pouco, são mais pálidos ainda que na fig. *K*, onde foram de propósito um tanto acentuados para evitar que desapareçam na reprodução. Pela formação dos gametos consome-se a totalidade do protoplasma dos dois gamontos, sem que sobrem corpos residuais. Não exibindo diferenças morfologicas, os gametos esféricos devem ser designados como isogametos; caso sejam sexualmente diferenciados, tal fenómeno subtraiu-se à nossa observação. Os gametos formam-se da maneira seguinte: dentro dos gamontos individualizam-se numerosos núcleos com os seus territórios protoplasmáticos circunjacentes, concretizando tal processo morfológico o conceito fisiológico da «enérgide». A individualização dos territórios núcleo-plasmáticos, que se tornam gametos, começa na periferia dos gamontos e estende-se sucessivamente para o centro. Nas fases médias da gametogonia (fig. *L*) as porções protoplasmáticas dos vários gametos em formação ainda continuam coerentes. Progredindo a divisão nuclear, progride ao mesmo tempo a delimitação das parcelas mais centrais, até se achar cada núcleo circundado por um fragmento de protoplasma que assume forma esférica.

Tendo a subdivisão do material protoplasmático dos gamontos abrangido tambem a zona de contato dos dois parceiros, desaparece a separação dêstes. Ainda se mantêm de certo modo separados os dois montões de gametos (fig. *M, g*), mas depois reunem-se, resultando da copulação zigotos alongados com sincárion unilateralmente situado (fig. *N, a*) e protoplasma vacuolizado. Medindo no início $1{,}5 \times 3\,\mu$ a seguir estiram-se mais ainda (fig. *N, b*), sendo então a sua largura cerca de $1\,\mu$, a longura cerca de $4\,\mu$. Com exclusão dos oocistos bem maiores ($7 \times 3\,\mu$), a esporogonia de *Schizocystis legeri* (KEILIN 1923, t. 4 f. 24-25) é muito semelhante à de *Sawayaella polyzoorum*. As tres divisões do sincárion vêm-se na fig. *N, c-g*. Segundo a nomenclatura de FANTHAM (1908, p. 411-412), o zigoto uninuclear deveria ser chamado de esporoblasto, porque dá origem aos esporozoitos. Desde que aparecem quatro núcleos no esporoblasto (fig. *N, d*), o seu contorno torna-se afilado nas duas extremidades, assumindo o esporoblasto assim o aspeto fusiforme comum de «esporo» ou «pseudonavicella». A camada externa, embora muito fina, é sólida, em consequência do desenvolvimento de um cisto, o esporocisto ou oocisto. O protoplasma do esporoblasto (fig. *N, c*) é mais homogêneo que o do zigoto (fig. *N, a, b*) e quasi não se tinge. Por isso não foi possivel acompanhar a divisão do protoplasma do esporoblasto, sendo sómente nítidos os

dois (fig. *N,c;* fig. *M,z*) quatro (fig. *N,d*) e oito (fig. *N, e-g*) núcleos dos esporozoitos em formação. Os oocistos vivos são diferentes dos fixados e coloridos. Nos vivos nada se vê dos esporozoitos, mostrando-se, porém, corpo residual refringente, de maneira que se dá caso paralelo ao oocisto de *Machadoella triatomae* (REICHENOW 1935, p. 436 f. 1 D no texto).

Os gametocistos maduros são repletos pelos oocistos cerrada e mais ou menos paralelamente situados, como se fossem empacotados. Nos próprios oocistos o lumen parece quasi totalmente preenchido pelos núcleos dos esporozoitos. Nos cistos inchados que passaram pela água e se acham engulidos por um polipídio, é mais desapertada a disposição dos oocistos, notando-se interstícios entre êles. Em tais cistos vê-se além disso um lugar de arrebentamento preformado, análogo aos esporodutos conhecidos em muitas Eugregarinas. O envólucro do gametocisto maduro é duplo, sendo o externo mais forte, o interno mais fino. Ao se exercer ligeira pressão sobre o cisto maduro vivente, dilata-se o orifício de arrebentamento existente no envólucro externo, evaginando-se o interno, evidentemente elástico, à maneira de uma hernia. Aumentada a pressão, rebenta o saco com que o envólucro interno se tinha resaltado, saindo então sucessivamente os oocistos. Quando o gametocisto entrado na cárdia do hospedador pelo caminho natural se abre sem pressão artificial, os oocistos dissolvem-se ainda dentro do gametocisto, espalhando-se os esporozoitos isoladamente no ceco. Por mais uniformes que apareçam os oocistos, revelam ao exame micrométrico dimensões diversas. Assim, foram medidos no hospedador, em que se têm originado, oocistos pequenos de $0{,}8 \times 3{,}6\,\mu$ e grandes de $1{,}7 \times 5{,}5\,\mu$, não ocorrendo porém tais diferenças dentro do mesmo gametocisto.

Os cerca de 14 oocistos, que podem ser contados no diâmetro dos maiores gametocistos, permitem avaliar em cerca de 1.000 o número total de oocistos contidos em um cisto maduro. Como se encontram no lumen do ceco e na região pilórica até 20 e no reto até 6 cistos no material examinado, poderiam ser produzidos mais que 200 mil esporozoitos quasi simultaneamente no intestino do mesmo hospedador. Tão enorme quantidade de germens propagativos proporciona ao parasita grande possibilidade de infecção de um novo hospedador. O crescimento dos Bryozoa em colónias representa outro momento favoravel para a conservação da espécie do parasita. Fatores desvantajosos no sentido aludido são primeiramente a especificidade da Gregarina, para cujo desenvolvimento não oferece qualquer espécie briozoária um meio idôneo e além disso o movimento contínuo do mar, assim pelo menos na localidade pesquizada por nós. Sem dúvida, foi no lado sotaven-

teado da ilha das Palmas (baía de Santos), que verificámos *Sawayaella polyzoorum,* mas mesmo aí nunca falta o fluxo e refluxo da resaca, de modo que as algas habitadas pelos hospedadores das Gregarinas se acham continuamente movimentadas. Ao atravessarem os cistos imóveis o mar, entre os polipídios do briário, inúmeros serão desviados, apesar de ser pequena a distância entre os vários indivíduos hospedadores.

Abundância de hospedadores em espaço pequeno e agitação do mar compensam-se como fatores ecológicos propício e prejudicial, respetivamente. Especificidade quanto ao hospedador e resistência consideravel do cisto que contem os oocistos são qualidades fisiológicas do parasita, contrárias a uma sua propagação muito vasta. Quando poderiam entrar em 100-1000 polipídios os outros tantos oocistos providos de 8 germens cada um, caso rebentasse o gametocisto no mar, é geralmente engulido o gametocisto intato por um polipídio. Apesar de tal infecção em massa, e da multiplicação esquizogônica, na verdade por nós considerada como facultativa em *Sawayaella polyzoorum,* tudo indica não sofrer seriamente o hospedador. O quadro geral é o de um parasitismo ou talvez melhor de um comensalismo equilibrado.

## SAWAYAELLA POLYZOORUM, GEN. NOV., SPEC. NOV. OF THE SCHIZOGREGARINES.

### *Abstract*

*The schizogregarine Sawayaella polyzoorum (fig. 1) was found in the gut of cheilostomatous Polyzoa, chiefly in Thalamoporella- species and once or twice in Watersipora cucullata. As the number of oocysts produced by each pair of associated gregarines varies between 100 and 1000, the new genus belongs to the Polysporea. Its schizogony is extracellular, but genera as Menzbieria show, that* FANTHAM'S *groups Ectoschiza and Endoschiza can not be maintained. The great diversity of the various genera of Schizogregarines supports* KEILIN'S *view, that the suborder (or order) is artificial, because schizogony was acquired independently by different forms of Eugregarines. In the key for classification the new genus stands near Caulleryella and Lipotropha, both found in dipterous larvae, and both with at the most 16 oocysts in one gametocyst. Sawayaella has a pseudomerite (plate 32, fig. G, and plate 33, H) like Caulleryella, but this process has not been seen attached to the cells of the coecal wall of the host. The trophozoites and gametocytes of Sawayaella liken those of Lipotropha figured by* KEILIN (WENYON *1926, f. 471, 1). They were examined living and after fixation. The living trophozoites showed exactly the same form as those in slides. Even in the not*

*encysted stages the parasite seems to be motionless, at least as trophozoite and gametocyte. Though often very numerous in the same polyzoan gut, the parasites do not seem to be injurious to the host; they do not even cause degeneration of the infected alimentary canals to «brown bodies». The polypides frequently ingest whole gametocysts, and the very small sporozoites escape in the coecum (plate 32, fig. A). One or more enter the same gut epithelium cell, where they lie in the central vacuole (plate 32, fig. B). Probably they also can grow to schizonts extracellularly, remaining in the intestinal fluid. Schizogony always takes place out of the cell, often in the region of the cardia (plate 32, fig. F). In the vegetative stages two karyosomes can be distinguished, a smaller red one, that stains deeply and a bigger and lighter blue one (plate 33, fig. H). The first disappears, when schizogony begins (plate 32, fig. E), the latter in gametogony. Sexual reproduction by isogametes succeeds within the gut cells (plate 33, fig. K, M), but can just as often be extracellular (fig. 1). Sporogony is of gregarine type. The zygotes form oocysts, each of which contains eight sporozoites (plate 33, fig. N). The great number of sporozoites (800-8000) in each gametocyst (plate 33, fig. O) and the closeness of the polypides in the colony of Polyzoa favour the parasite, but the lively peristaltic movement of the polyzoan gut, where the food passes continuously, undoubtedly eliminates many immature stages. Moreover the water of the locality, where the parasite has been found (shallow water at the «ilha das Palmas» in the entrance of the bay of Santos), is never quite calm, so that the passage of the gametocysts and oocysts from one host to the other is perilous. Sawayaella shows a certain host-specifity, it has not been found in three other Polyzoa growing on the same weed as the infected Thalamoporella.*

## BIBLIOGRAFIA


Awerinzew, S. — 1909 — Studien über parasitische Protozoen. III. Beobachtungen über die Vorgänge der Schizogonie bei Gregarinen aus dem Darme von Amphiporus spec.. *Arch. Protistenk.*, Jena, **16**, 71-80 t. 4.

Becker, G. — 1937 — Untersuchungen über den Darm und die Verdauung von Kamptozoen, Bryozoen und Phoroniden. *Zeitschr. Morph. Oekol.*, Berlin, **33**, 72-127.

Borg, F. — 1926 — Studies on recent Cyclostomatous Bryozoa. *Zool. Bidr. Uppsala*, **10**, 181-507 t. 1-14.

Brasil, L. — 1902 — Joyeuxella toxoides, n. g., n. sp., sporozoaire parasite de l'épithélium intestinal de Lagis koreni Malmgr.. *Arch. Zool. exp. gén.* Paris, sér. 3, **10**, Notes et Revue, p. V-VII.

Brasil, L. — 1906 — Eleutheroschizon duboscqui, sporozoaire nouveau parasite de Scoloplos armiger O. F. Müll.. *Arch. Zool. exp. gén.* Paris, sér. 4, **4**, Notes et Revue n.º 2, p. XVII-XXII.

BRASIL, L. — 1907 — Recherches sur le cycle évolutif des Selenidiidae, grégarines parasites d'Annélides polychètes. 1. La schizogonie et la croissance des gamétocytes chez Selenidium caulleryi n. sp. *Arch. Protistenk.*, Jena, 8, 370-397 t. 15.

BRASIL, L. — 1909 — Documents sur quelques sporozoaires d'annélides. *Arch. Protistenk.*, Jena, 16, 107-142 t. 7-10.

BRESSLAU, E. & BUSCHKIEL, M. — 1919 — Die Parasiten der Stechmückenlarven. a) Allgemeines por E. BRESSLAU; b) Caulleryella pipientis por M. BUSCHKIEL. *Biol. Zentralbl.*, Leipzig, 39, 325-336.

BUDDENBROCK, W. v. — 1928 — Grundriss der vergleichenden Physiologie. 830 pp. 3 t. Berlin.

BUSCHKIEL, M. — 1921 — Caulleryella pipientis n. sp., etc. *Zool. Jahrb. Anat.* Jena, 43, 97-148 t. 4-5.

CAULLERY, M. & MESNIL, F. — 1898 — Sur un Sporozoaire aberrant (Siedleckia n. g.). *C. R. Soc. Biol., Paris,* sér. 10 v. 5, 1093-1095.

CHATTON, E'. & VILLENEUVE, F. — 1936 — Le cycle évolutif de l'Eleutheroschizon duboscqui Brasil. Preuve expérimentale de l'absence de Schizogonie chez cette forme et chez la Siedleckia caulleryi CH. & VILLEN. *C. rend. Ac. Sci., Paris,* 203, 833-836.

DELKESKAMP, K. — 1930 — Biologische Studien über Carabus nemoralis Müll., *Zeitschr. Morph. Oekol.*, Berlin, 19, 1-58.

DOFLEIN, F. - REICHENOW, E. — 1929 — Lehrbuch der Protozoenkunde, Jena, 5.ª ed. VIII + 1262 pp.

DOGIEL, V. — 1907 — Beiträge zur Kenntnis der Gregarinen. II. Schizocystis sipunculi. *Arch. Protistenk.*, Jena, 8, 203-215 t. 9.

FANTHAM, H. B. — 1908 — The Schizogregarines: a review and a new classification. *Parasitology,* Cambridge, 1, 369-412.

FARIA, GOMES DE, CUNHA, MARQUES DA & FONSECA, O. DA — 1917 — Sobre os protozoarios parasitos da Polydora socialis. Reimpresso do *Brazil Medico,* Rio de Janeiro, ano 31 n.º 29 (21. VII. 1917) 2 p.

GODOY, A. & PINTO, C. — 1922 — Caulleryella maligna, n. sp. Schizogregarina pathogenica para Cellia allopha Lutz & Peryassú (nota previa). *Brazil Medico,* Rio de Janeiro, anno 36 v. 1, p. 46-47.

GRELL, K. G. — 1938 — Untersuchungen an Schizogregarinen. 1. Lipocystis polyspora n. g. n. sp., eine neue Schizogregarine aus dem Fettkörper von Panorpa communis L., *Arch. Protistenk.*, Jena, 91, 526-545. 2 tab.

HAGENMÜLLER, P. — 1899 — Bibliotheca Sporozoologica, etc. *Ann. Mus. Hist. nat. Marseille,* sér. 2 Bull. v. 1 Supplém., p. 1-233.

HARTMANN, M. — 1923 — Sporozoa. Kükenthal-Krumbach, *Handb. Zool.,* Berlin & Leipzig. 1, 186-255 (Gregarinida p. 219-231).

HASSELMANN, G. — 1926 — Schizogregarinas parasitas de Polychetos do Brasil. *Bol. Inst. Brasil Sci.,* Rio de Janeiro, 2, 159-162 (contem especies do gen. Selenidium).

HATT, P. — 1927 — Le début de l'évolution des Porospora chez les Mollusques. *Arch. Zool. exp. gén.*, Paris, 67, (1927-1928), Notes et Revue n.º 1, p. 1-7.

HESSE, E. — 1909 — Contribution à l'étude des Monocystidées des Oligochètes, *Arch. Zool. exp. gén.*, Paris, sér. 5, 3, (1909-1910), p. 27-301 t. 1-7.

JORDAN, H. J. & HIRSCH, G. C. — 1927 — Über einige vergleichend-physiologische Probleme der Verdauung bei Metazoen. Bethe, *Handb. norm. path. Physiol.* 3, 24-101. Berlin.

KEILIN, D. — 1923 — On a new Schizogregarine, Schizocystis legeri n. sp., an intestinal parasite of dipterous larvae (Systenus). *Parasitology,* Cambridge, 15, 103-108 t. 4.

KEILIN, D. — 1923 *a* — The structure and life-history of Lipotropha, n. gen., a new type of Schizogregarine, parasitic in the fat body of a dipterous larva (Systenus). *Proc. Cambridge Phil. Soc.* (Biol. ser.), 1, 18-29 t. 3-4, (trabalho não visto por mim, citado segundo WENYON, 1926 e Zoologischer Bericht, v. 13 n.º 927).

KUDO, R. — 1931 — *Handbook of Protozoology.* 451 pp. Springfield, Ill. & Baltimore, Md.

LÉGER, L. — 1900 — Sur un nouveau sporozoaire des larves de Diptères (Schizocystis). *C. rend. Ac. Sci., Paris,* 131, 722.

LÉGER, L. — 1907 — Les Schizogrégarines des Trachéates. I. Le genre Ophryocystis. *Arch. Protistenk.,* Jena, 8, 159-202 t. 5-8.

LÉGER, L. — 1910 — Les Schizogrégarines des Trachéates. II. Le genre Schizocystis. *Arch. Protistenk.,* Jena, 18, 83-110 t. 5-6.

LÉGER, L. & DUBOSCQ, O. — 1902 — Les Grégarines et l'épithélium intestinal chez les Trachéates. *Arch. Parasitol.,* Paris, 6, 377-473 t. 2-6.

LÉGER, L. & DUBOSCQ, O. — 1908 — L'évolution schizogonique de Aggregata (Eucoccidium) eberthi (Labbé). *Arch. Protistenk.,* Jena, 12, 44-108 t. 5-7.

LÉGER, L. & DUBOSCQ, O. — 1910 — Selenococcidium intermedium Lég. & Dub. et la systématique des Sporozoaires. *Arch. Zool. exp. gén.,* Paris, sér. 5, 5, 187-238 t. 1-2.

LÉGER, L. & DUBOSCQ, O. — 1911 — Spirocystis nidula, n. g. n. sp.. *Bull. zool. France,* Paris, 36, 62-63.

LÉGER, L. & HAGENMÜLLER, P. — 1900 — Sur la morphologie et l'évolution de l'Ophryocystis Schneideri, n. sp.. *Arch. Zool. exp. gén.,* Paris, (sér. 3) 8, Notes et Revue, p. XL-XLV.

LENGERKEN, H. v. — 1924 — Coleoptera. Schulze, P., *Biol. Tiere Deutschl.,* pars 40 (1924-1927), p. 1-346. Berlin.

MACHADO, A. — 1913 — Sobre o ciclo evolutivo de Schizocystis spinigeri n. sp. Gregarina do intestino de uma especie de Spiniger. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, 5, 5-15 t. 1-3.

MACKINNON, D. L. & RAY, H. N. — 1933 — The life cycle of two species of Selenidium from the Polychaete worm Potamilla reniformis. *Parasitology,* Cambridge, 25, 143-162 t. 13-17.

MINCHIN, E. A. — 1903 — Sporozoa. E. Ray Lankester, *A treatise on Zoology.* Part I., p. 150-360. London.

NAVILLE, A. — 1930 — Recherches cytologiques sur les Schizogrégarines. 1. Le cycle évolutif de Mattesia dispora n. g. n. sp. *Zeitschr. Zellforsch. & mikrosk. Anat.* Berlin, 11, p. 375-396 t. 5.

PATTEN, R. — 1936 — Notes on a new Protozoon, Piridium sociabile, n. gen., n. sp., from the foot of Buccinum undatum. *Parasitology,* Cambridge, 28, 502-516.

PINTO, C. — 1922 — Contribuição ao estudo das Gregarinas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* Rio de Janeiro, 15, 84-108 t. 1-6.

PORTER, A. — 1908 — A new Schizogregarine, Merogregarina amaroucii, nov. gen., nov. sp., parasitic in the alimentary tract of the composite Ascidian Amaroucium sp. *Arch. Zool. exp. gén.*, Paris, sér. 4, v. 9 (1908-1909), Notes et Revue 1908 n.º 1, p. XLIV-XLVIII.

PORTER, A. — 1909 — Merogregarina amaroucii nov. gen. nov. sp., a Sporozoön from the Digestive Tract of the Ascidian Amaroucium sp.. *Arch. Protistenk.*, Jena, 15, 227-248 t. 22.

REED, N. — 1933 — Sporogony in Selenidium mesnili Brasil, a sporozoan parasite of Myxicola infundibulum Mont.. *Parasitology,* Cambridge, 25, 402-409 t. 24-27.

REICHENOW, E. — 1932 — Sporozoa. Grimpe, *Tierw. Nord-& Ostsee,* pars 2g, p. 1-88. Leipzig.

REICHENOW, E. — 1935 — Machadoella triatomae, n. g. n. sp., eine Schizogregarine aus Triatoma dimidiata. *Arch. Protistenk.*, Jena, 84, 431-445 t. 10.

RIES, E. — 1936 — Fütterungsversuche bei Zoobotryon. *Zeitschr. vergl. Physiol.*, Berlin, 23, 64-99.

SCHNEIDER, A. — 1875 — Contributions à l'histoire des Grégarines des Invertébrés de Paris et de Roscoff. *Arch. Zool. exp. gén.*, Paris, (sér. 1), 4, 493-604 t. 16-22.

SCHNEIDER, A. — 1883 — Ophryocystis Bütschlii (n. sp.) *C. rend. Ac. Sci., Paris,* 96, 1378.

SCHNEIDER, A. — 1884 — Ophryocystis Bütschlii sporozoaire d'un nouveau type. *Arch. Zool. exp. gén.*, Paris, (sér. 2) 2, 111-126 t. 6.

STEOPOE, J. — 1928 — Une nouvelle Schizogrégarine coelomique chez Nepa cinerea L. *C. R. Soc. Biol., Paris,* 98, 1365-1366.

SUMNER, R. — 1936 — Relation of Gregarines to growth and longevity in the Mealworm, Tenebrio molitor L. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, Columbus, Ohio, 29, 645-648.

WENYON, C. M. — 1926 — Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists. v. 2 p. I-IX + 779-1563. London.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

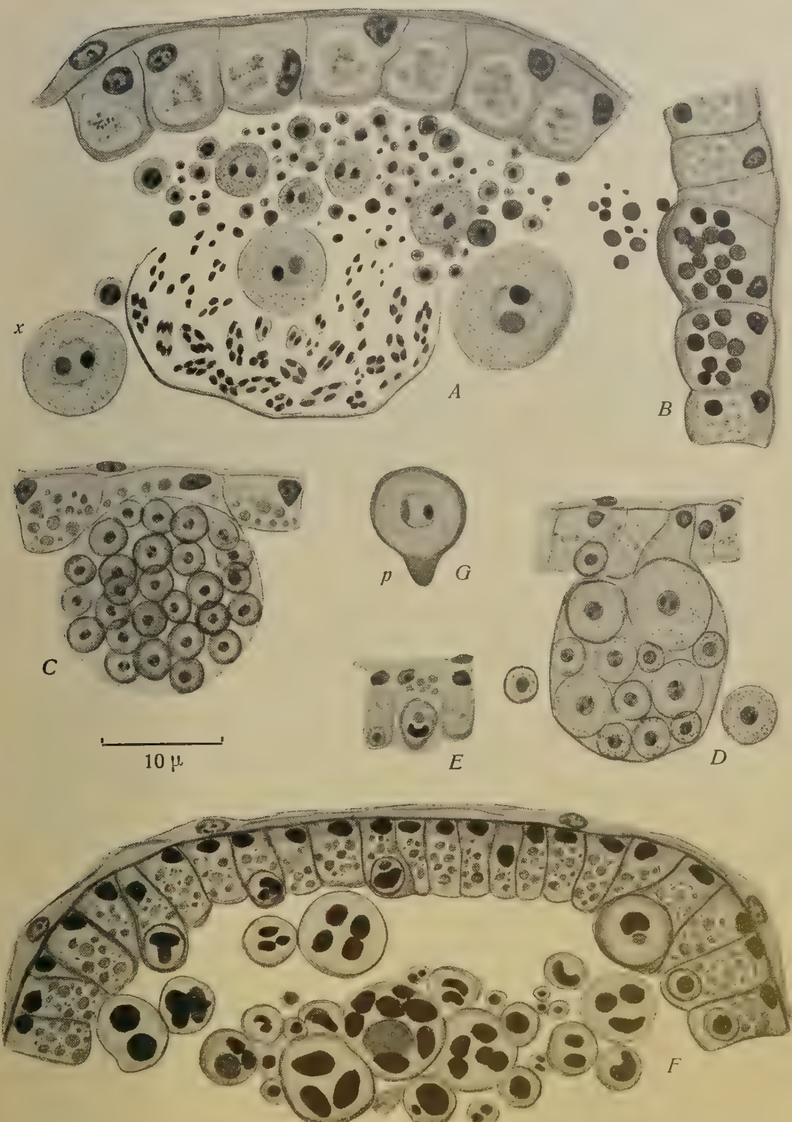
### Estampa 32

**Fig. *A*** — Gametocisto em dissolução; os esporozoitos saem dos oocistos. Um dos trofozoitos *(x)* mostra irradiação do núcleo.
**Fig. *B*** — Esporozoitos entrados no epitélio do ceco.
**Fig. *C*** — Numerosas fases vegetativas em crescimento dentro do vacúolo alargado da mesma célula intestinal.
**Fig. *D*** — Crescimento intracelular diferentemente rápido de vários trofozoitos.
**Fig. *E*** — Um esquizonto emigra da célula intestinal.
**Fig. *F*** — Esquizogonia; o cariosoma vermelho desaparece.
**Fig. *G*** — Trofozoito com o pseudomerito *(p)* estendido.

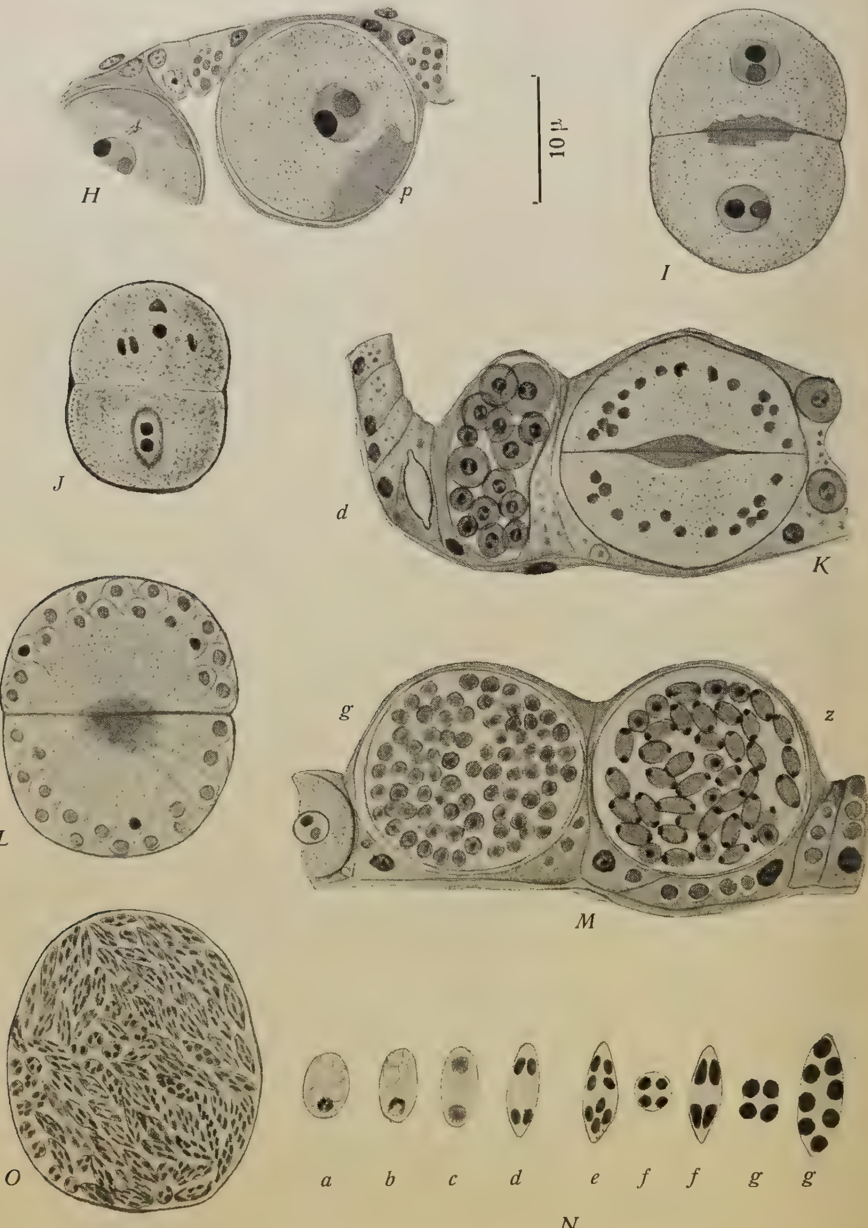
### Estampa 33

**Fig. *H*** — Trofozoitos intracelulares com os pseudomeritos *(p)* retraidos.
**Fig. *I*** — Sizigia de dois gamontos (gametocitos).
**Fig. *J*** — Gametocisto com o início da gametogonia nos dois gamontos.
**Fig. *K*** — Gametogonia no gametocisto intracelular; multi-infecção de uma célula vizinha; *d*, casca de uma Diatomácea.
**Fig. *L*** — Continuação da gametogonia num gametocisto livre.
**Fig. *M*** — Gametos formados *(g)* e esporogonia *(z)*, sendo os dois gametocistos intracelulares.
**Fig. *N*** — Esporogonia. *a-b*, zigoto; *c*, o zigoto torna-se esporoblasto; *d-e*, 4 e 8 núcleos dos esporozoitos aparecem; *f-g*, oocistos maduros vistos de cima e do lado com posições diferentes dos núcleos dos esporozoitos.
**Fig. *O*** — Cisto (gameto-ou sizigiocisto) maduro com oocistos formados.

———o———


x
A
B
C
p
G
E
D
10 μ
F

Estampa 33



Vol. 10 — Art. 18 Dezembro de 1939

# ETIOLOGIA DA PNEUMONIA CONTAGIOSA DOS SUINOS

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em pesquisas anteriores sobre a histopatologia da broncopneumonia dos suinos (1), fizemos notar a possibilidade da existencia de uma identidade causal entre esta molestia e outras, descritas sob as denominações de influenza (SHOPE 7. 8) e gripe dos leitões (KÖBE 3), dadas as semelhanças dos caracteres morfologicos existentes entre elas. Nossas observações e pesquisas experimantais confirmam aquela suposição.

Influenza e gripe foram descritas respetivamente por SHOPE, nos Estados Unidos em 1931 e KÖBE na Alemanha em 1933 e ambas são produzidas por virus filtraveis, ocorrendo comumente associados a germens do genero Hemophilus: *Hæmophilus influenzae suis* (SHOPE e LEWIS 4).

Sobre a sua identidade ha diversidade de opiniões. Em geral os autores alemães acreditam, com KÖBE, que se trata de uma só entidade morbida, residindo a diferença dos caracteres das molestias descritas, tão sómente numa variação de virulencia ou patogenicidade dos agentes. Outros, como os americanos, acompanham mais a opinião de SHOPE, de que são duas doenças distintas.

Dos trabalhos do ultimo depreende-se que a denominada influenza dos porcos se manifesta em extensas regiões dos Estados Unidos, particularmente no Outono e no inverno, com um carater epizootico agudo.

A molestia atinge animais de qualquer idade (de preferencia entre 6 a 10 mezes); os sintomas são representados por febre, apatia, tosse e perda de apetite. O restabelecimento se dá depois de dois a seis dias, atingindo a mortalidade a porcentagem de 2 a 4 %.

A gripe (KÖBE 3, WALDMANN 10), ao contrario, é uma doença enzootica. Ataca sómente animais novos até pouco além da época do desmame e evolue com sintomas mais ou menos identicos aos da influenza: tosse, apatia e perda de apetite. A mortalidade dos animais que ainda mamam oscila entre 20 e 80 %; os animais que não morrem ficam com a doença em estado cronico e não se desenvolvem.

Sobre experiencias de imunidade cruzada entre influenza e gripe, nada acusa a literatura.

## OBSERVAÇÕES PROPRIAS

O quadro clinico da molestia por nós em S. Paulo estudada corresponde ao da gripe; a doença tem tambem aqui um caracter de pneumonia enzootica.

Nossas observações clinicas e anatomopatologicas da doença são baseadas no exame de 64 casos de infecção espontanea e 41 de doença experimental. As pesquisas clinicas foram completadas pelo exame de grande numero de animais doentes, encontrados em numerosas criações, no interior do Estado. Verificámos que a infecção póde dar-se nas primeiras horas ou mesmo nas primeiras semanas de vida, e até no 4.º ou 5.º mês. Durante o periodo de aleitamento, mesmo quando infectados, os animais não mostram, em geral, sinais aparentes da doença. Observámos os primeiros sintomas na época do desmame. Frequentemente assinalámos tosse, apatia muito pronunciada e anorexia. Observámos que nesta fase a molestia ou evolue com um curso agudo rapidamente mortal, ou passa um estado crónico, no qual aos sintomas já descritos se ajunta um emagrecimento progressivo, parada de crescimento, conjuntivite catarral ou mesmo catarral-purulenta, perda de pêlo e rinite.

Em grande numero de animais observados, com a molestia natural e sobretudo nos experimentalmente infectados, verificámos diariamente a temperatura retal. Alguns deles foram mesmo observados durante longo tempo, tomando-se a temperatura duas vezes por dia. O aspéto da curva termica nada apresenta de caracteristico. A temperatura oscila comumente entre limites normais, ou é ligeiramente elevada (39,8 no maximo foi o que observámos).

Em geral os animais em que a molestia toma a forma crónica não morrem, mas então é regra não se desenvolverem, ou crescerem muito lentamente, permanecendo sempre «atrazados» e portadores da doença. Mesmo nesse estado, constatámos poder sobrevir a morte pela passagem da doença a um estado agudo, como acontece em consequencia de resfriamentos.

A mortalidade dos animais na época do desmame é muito variavel, atingindo muitas vezes numeros elevados: oscila entre 10 % até 60 % ou mais.

A doença tem um alto poder de difusão. Acreditamos que numa criação infectada, a porcentagem de animais contaminados chega a 100 %; no entanto muito frequentemente a doença evolue em forma benigna, e o desenvolvimento dos leitões se dá em condições normais.

O aparecimento da pneumonia com o quadro caracteristico pareceu-nos fortemente influenciado pelas condições de higiene dos locais de criação. Si em criações onde os cuidados de higiene são severamente

levados em consideração, a mortalidade, e os casos de molestia aparente, são escassos, ao contrario, em locais mantidos em más condições de higiene a porcentagem é assaz elevada. Os resfriamentos têm tambem um papel de destaque, favorecendo o aparecimento da doença.

## BACTERIOLOGIA DA DOENÇA ESPONTANEA

A flóra bacteriana da broncopneumonia é variada. Em diversos casos a pesquisa bacteriologica resultou negativa; em outros encontrámos bacterias varias, insoladas ou associadas: Salmonelas, B. Colli e Para-Colli, Pasteurelas, Cocos, Alcaligenes e, em alguns casos, um germen do genero Hemophilus.

No quadro abaixo damos a relação dos casos estudados bacteriologicamente.

Não nos referimos á idade dos animais examinados, por não termos, na maior parte dos casos, conseguido obter dados exátos; no entanto, no geral tratava-se de leitões de um a quatro meses de idade.

QUADRO 1

| N.o | Lesão | Result. bacteriologico | N.o | Lesão | Result. bacteriologico |
|---|---|---|---|---|---|
| 4 | Br. | Salmonela | 109 | Br. | Pasteurela |
| 35 | A. | esteril | 110 | A. | esteril |
| 39 | Br. | Para-Coli | 111 | A. | esteril |
| 42 | Br. | Para-Coli | 114 | A. | esteril |
| 43 | Br. | Salmonela | 116 | A. | esteril |
| 44 | A. | esteril | 122 | Br. | Hemophilus, Salmonela |
| 45 | A. | esteril | 126 | A. | esteril |
| 46 | Br. | Salmonela | 127 | A. | esteril |
| 68 | Br. | esteril | 132 | A. | esteril |
| 72 | Br. | Pasteurela | 141 | A. | esteril |
| 73 | Br. | esteril | 144 | Br. | Hemophilus, Salmonela |
| 75 | Br. | Hemophilus, Para-Coli | 149 | Br. | Salmonela |
| 76 | Br. | Salmonela | 153 | Br. | Pasteurela |
| 77 | Br. | Estafilococos | 154 | Br. | esteril |
| 78 | Br. | esteril | 157 | A. | esteril |
| 79 | Br. | Hemophilus, Estafilococos | 159 | A. | esteril |
| 80 | Br. | esteril | 160 | Br. | Salmonela |
| 81 | Br. | esteril | 161 | Br. | Hemophilus, Estafilococos |
| 82 | A. | esteril | 164 | Br. | Pasteurela |
| 85 | Br. | Alcaligenes | 165 | Br. | Salmonela |
| 86 | Br. | Hemophilus, Pasteureja | 168 | A. | esteril |
| 98 | Br. | Pasteurela | 184 | A. | esteril |
| 100 | Br. | Coli | 185 | A. | esteril |
| 106 | Br. | Coli | 186 | A. | esteril |

Br. - Broncopneumonia. — A. - Atelectasia.

Técnica de pesquisa bacteriologica — Como meios de cultura usámos caldo simples, caldo adicionado de pequena porção de sangue hemolisado de carneiro, agar simples, agar sangue e agar chocolate. O material a semear era retirado sistematicamente por meio de pipeta estéril, de diversas porções do pulmão e dos bronquios.

Usámos frequentemente o agar chocolate, pelo fáto de logo no inicio do estudo termos isolado em placa de agar sangue um Hemophilus, e de se conhecer pelos estudos de SHOPE e KÖBE a nitida preferencia dessa bacteria pelo agar chocolate. (Agar comum a 2 % PH 7,2-7,4 — 100 cc.; adicionado de 5 cc. de sangue desfibrinado de cavalo. Fusão do agar, depois resfriamento a 60°, junção do sangue e em seguida Banho-Maria 5 m. até aparecimento de côr chocolate).

E' entretanto de interesse referir que as amostras do Hemophilus que isolámos não se comportam, em relação ao agar chocolate, conforme as observações desses autores. Não sabemos se isso decorre de alguma diferença no preparo dos meios de cultura ou de propriedades diferentes dos germens; o fáto é que o crescimento das nossas amostras em agar sangue foi nitidamente superior ao obtido em agar chocolate.

Um estudo mais acurado das amostras do Hemophilus tinha necessariamente de ser levado a efeito, pois que não encontrámos referencia na literatura, que permita supor já haver sido verificada entre nós a existencia desse germen infectando porcos.

Para isso já conseguimos, até a conclusão do presente trabalho, isolar e observar 12 amostras.

Este germen, de acôrdo com as propriedades basicas do genero, tem a caracteristica de, quando recentemente isolado, crescer sómente em meios contendo hemoglobina. Obtivémos crescimento muito satisfatorio, como já mencionámos, no agar sangue. O desenvolvimento em caldo sangue é muito lento, ou completamente nulo.

No agar-sangue, as colonias de 24 a 48 horas são em geral puntiformes, alcançando no maximo quasi um milimetro de diametro e isso raramente. As colonias têm sempre tendencia a se desenvolver agrupadamente umas muito proximas ás outras, apresentando-se, porisso, de dimensões muito pequenas e quasi confluentes, formando um estrato granuloso. Têm côr branco-acinzentada, são globulosas e de superficie lisa e brilhante. Neste meio, a cultura permanece viva no maximo de 4 a 6 dias.

O agar chocolate, embora não pareça um meio tão proprio ao desenvolvimento, como o agar sangue, tem porém a vantagem de ser mais conveniente para a conservação do germen. Neste meio e na temperatura ambiente as culturas permanecem vivas, em média, por um periodo maximo de 30 dias. As colonias raramente crescem isoladas

e são ainda menores do que no agar-sangue. Em geral apresentam-se reunidas formando um estráto finamente granuloso de côr branco-acinzentada, dando ao meio uma coloração verde pálida.

Embora se apresente em geral nas culturas iniciais como um bacilo Gram negativo, pequeno, polimorfo, imovel e disposto em grupos, encontrámos em alguns casos, em culturas de 24h. e quando a bacteria é recentemente isolada do pulmão, bacilos Gram negativos, longos, finos e imoveis, de estremidades irregulares, e isolados. Em passagens subsequentes pelos meios culturais, a bacteria modifica então o seu aspéto, tomando os caracteres normais.

O germen tem uma caracteristica interessante, já observada com o *Hæmophilus influenzae* da gripe humana, por GRASSBERGER, que é a predileção pelo crescimento em satelitismo com bacterias de contaminação (Estafilococos, Coli, etc.).

## EXPERIENCIAS COM FILTRADOS

De acôrdo com o que referimos, dadas as semelhanças das alterações da broncopneumonia com as da influenza e da gripe dos leitões e estabelecida como relatámos a existencia de uma flóra microbiana muito variada, e, ainda mais, a negatividade da prova bacteriologica mais ou menos frequente, porém com quadros anatomopatologicos sempre correspondentes, procedemos á pesquisa de um virus filtravel, como agente essencial das alterações pulmonares, partindo dos trabalhos de SHOPE e de KÖBE.

O material de experiencia era sempre retirado de animais sacrificados durante o decurso agudo da doença. Os fragmentos de pulmão doente eram finamente triturados, e deles tirado um extráto (em agua fisiologica) que era em seguida filtrado em velas Berkefeld N.

Pesquisas sobre a ação do filtrado foram feitas em 18 animais.

A principio, não conhecendo a existencia de um agente filtravel e desejando uma ação mais diréta do filtrado sobre o pulmão, fizemos a inoculação de (5 cc.) por via intrapulmonar e intrapleural. Foram infectados com esta técnica 4 animais de cerca de 4 meses de idade. O primeiro apresentou, alguns dias após a inoculação, sinais identicos aos da doença espontanea: fórte apatia e tosse. Morreu 14 dias após. A necropsia revelou lesões de broncopneumonia purulenta aguda, disseminada em todo o pulmão esquerdo (lado da inoculação) e pleuriz fibrinosa. Fórte atelectasia do pulmão direito com pequena área de broncopneumonia purulenta no lóbo médio. O exame bacteriologico demonstrou a presença de Salmonela.

A passagem de material infectante deste primeiro caso foi feita para 3 outros animais. Todos mostraram sintomas discretos da doença

e foram sacrificados 20 dias após. A' necropsia encontrámos sómente pequena atelectasia pulmonar. Atribuimos a discreção dos sintomas e das alterações ao fáto de termos empregado animais já muito desenvolvidos. SHOPE e KÖBE, obtem ótimos resultados com leitões de 2 a 4 semanas.

Em experiencias posteriores usamos a técnica de infecção descrita por MC BRYDE, NILES e MOSKEY (5), que consiste na instilação nasal do material infectante após uma narcose profunda pelo eter. Passámos a trabalhar tambem com animais bem novos, de 2 a 6 semanas de idade.

Em todas as experiencias fizemos a infecção por via nasal, com 10 cc. de filtrado. Desse modo foram infectados mais 14 animais. Todos mostraram logo de inicio apatia e conjuntivite catarral. Foram sacrificados após, 12 e 15 dias.

O exame histologico dos pulmões revelou em todos os casos alterações inflamatorias intensas muito semelhantes ás descritas na influenza e gripe dos leitões, e das quais nos ocuparemos posteriormente.

As alterações macroscopicas são no entanto muito pouco pronunciadas, em consequencia do que, podem passar facilmente despercebidas: em geral o pulmão mostra atelectasia e uma coloração levemente pardacenta.

Os exames bacteriologicos resultaram sempre negativos, com excessão do primeiro caso, do qual, como referimos, isolámos uma Salmonela. Os sintomas e alterações pulmonares encontradas foram, portanto, seguramente provocadas pela ação do filtrado.

Os animais mantidos como testemunhas mantiveram-se sãos e não apresentaram alterações pulmonares.

Baseados nessas observações, concluimos que: a) Filtrados de extráto de pulmão de animais portadores da broncopneumonia produzem, quando introduzidos nas vias respiratorias de animais sãos, reações inflamatorias intensas, que pódem ser observadas sómente pelo exame histologico; b) as lesões obtidas são identicas ás observadas muitas vezes na pratica, em animais com sintomas da broncopneumonia.

## A INFECÇÃO DUPLA

As observações descritas levaram nos a admitir a necessidade de uma infecção dupla, isto é, da associação do filtrado a uma bacteria, para se dar o desencadeamento do quadro tipico da broncopneumonia. Esta hipotese foi-nos sugerida pelos trabalhos de SHOPE e KÖBE.

A pesquisa de uma possivel ação isolada das bacterias geralmente encontradas nos casos espontaneos, embora desnecessaria, dados os resultados negativos obtidos por outros autores (3. 4), tinha obrigatoriamente que ser levada em consideração.

Nos casos da doença natural, a flóra microbiana é, como referimos, variada. A escolha das bacterias a experimentar recaíu nas mais comumente isoladas em cultura pura e de casos recentes. Provámos a ação do Hemophilus, Salmonela e Pasteurela, isoladamente ou associados ao virus.

Nestas provas tinhamos em vista conhecer em primeiro lugar possiveis reações daquelas bacterias isoladas, sobre pulmão; em segundo lugar o papel da associação (filtrado mais bacteria) e por fim o papel de outras bacterias além do Hemophilus como influenciando o aparecimento da pneumonia, após a associação com o virus.

Pesquisas sobre a patogenicidade de bacterias isoladas foram feitas em 12 animais de 2 semanas de idade, divididos em 3 grupos. Os leitões de cada grupo foram infectados por instilação nasal, com emulsão (10 cc.) de bacterias (Hemophilus, Salmonela e Pasteurela) obtida de cultura de 24 h. em agar-sangue. Não mostraram sintomas da doença. Foram sacrificados 12 dias mais tarde. Os achados de necropsia foram negativos.

Pesquisas sobre a associação foram levadas a efeito em outra série de animais.

Exp. I — 4 leitões de 14 dias de idade foram infectados por instilação nasal com mistura (10 cc.) de filtrado de mat. 162 e emulsão em agua fisiologica, de cultura, de Hemophilus (144), obtida em agar-sangue 24 h..

Sinais clinicos: fórte apatia.

Foram sacrificados 14 dias após a infecção. Em todos encontrámos fórte atelectasia pulmonar e fórte tumefação e vermelhidão dos ganglios linfaticos regionais, porém ausencia de sinais macroscopicos de pneumonia. O exame histologico dos pulmões revelou processos descamativos e pequena infiltração por mononucleares.

Exp. II — 3 leitões de 14 dias de idade receberam por instilação nasal 10 cc. de mistura de filtrado (mat. 162) e emulsão de Pasteurela (72), de cultura em agar-sangue, 24 horas. Sinais clinicos: pequena apatia.

Sacrificados depois de 14 dias. As alterações macroscopicas constavam sómente de atelectasia e hiperemia acentuada. Pesquisas histologicas: processos descamativos; fórte hiperemia.

Exp. III — Em 3 leitões de 16 dias de idade foi feita instilação nasal de 10 cc. de mistura de filtrado (mat. 164) e emulsão de Salmonela (160), de cultura em agar-sangue, 24 horas. 4 dias após a inoculação morreu um leitão, com pneumonia purulenta de alto gráo, em ambos os pulmões. Os outros dois animais morreram no 12.º dia de doença, com identicas lesões.

Os testemunhas mantiveram-se sãos.

## A DOENÇA DO VIRUS E A INFECÇÃO DUPLA

Nossas observações permitem concluir que a pneumonia contagiosa dos leitões tem como agente principal um virus filtravel de propriedades muito semelhantes aos virus da influenza e da gripe descritas por SHOPE e KÖBE. Confirmando observações desses autores, conseguimos assinalar que o virus é, por si só, capaz de determinar o desenvolvimento de alterações pulmonares discretas e de sintomas ás mais das vezes pouco pronunciados, mas que em alguns casos são identicos aos descritos nos casos tipicos de pneumonia. Pudémos observar que a infecção espontanea pelo virus póde dar-se lógo após o nascimento, sem que se notem no entanto quaesquer sinais clinicos da doença; estes aparecem em geral algumas semanas mais tarde.

Esta «doença de virus» (em analogia á designação de SHOPE — «Filtrate disease» —), tende em geral para a cura; no entanto encontrámos numerosos casos de doença crónica com «atrazo» e demais sintomas causados sómente pela ação do virus. Este encontro seria explicado por uma menor resistencia do animal. Não pudemos constatar casos de morte pela ação exclusiva do virus, como refere KÖBE.

O virus tem um extraordinario poder de difusão. Em locais contaminados, todos os animais novos, ao que parece, contráem a infecção. Cuidados de higiene, boa alimentação e proteção contra o frio, impedem infecções secundarias, razão por que em muitas criações a doença passa quasi que despercebida.

O desencadeamento do quadro tipico da pneumonia dá-se pela infecção bacteriana secundaria.

LEWIS e SHOPE (4), bem como KÖBE (3), WALDMANN (10) e outros, conseguiram demonstrar um germen do genero *Hæmophilus* como achado constante em casos de influenza ou gripe dos leitões. Para aqueles autores uma associação do virus ao Hemophilus seria a condição essencial no desenvolvimento da pneumonia.

SHOPE, não só em casos espontaneos, como de infecção experimental pelo virus, refere o encontro quasi sistematico do *Hæmophilus influenzae suis* isolado, ás mais das vezes, em cultura pura. Identicas observações são de KÖBE e WALDMANN.

A infecção secundaria por outras bacterias não foi observada, ou pelo menos tomada em consideração. E' citado por aqueles autores o encontro de outras bacterias (principalmente Pasteurela) aparecendo, no entanto, como germens de contaminação, após o periodo inicial e agudo da molestia.

Os resultados de nossas experiencias em casos de doença espontanea e na infecção experimental pelo virus, divergem em parte dos desses autores.

Confirmando observações deles, conseguimos isolar algumas vezes, de animais normais, o Hemophilus; nem uma vez porém o isolamos de animais infectados experimentalmente pelo virus.

Na doença espontanea, conforme mostra o quadro 1, encontrámos em diversos casos o Hemophilus, porém sempre associado a outra bacteria.

A pesquisa bacteriologica foi negativa em alguns casos de pneumonia, mesmo em estado hiperagudo. E' conhecida, porém, a pequena capacidade de resistencia do Hemophilus, que, como é de acreditar desapareceria imediatamente após o desenvolvimento do quadro pneumonico. Os caracteristicos histologicos apoiam plenamente esta suposição.

Em nossas experiencias sobre a associação do virus ao Hemophilus não obtivemos o quadro caracteristico da pneumonia. Este fáto é tambem assinalado por KÖBE, que supõe seja devido a uma diminuição de patogenicidade do Hemophilus, pela cultura em meios artificiais. Causas exteriores (principalmente temperatura) parecem-nos, no entanto, desempenhar um papel importante no desenvolvimento do quadro da pneumonia.

Julgamos de importancia a possibilidade do desenvolvimento da infecção secundaria, por germens outros que não o *Hæmophilus influenzae suis,* e as nossas pesquisas permitiram-nos concluir que além desta bacteria, outras pódem associar-se aos virus, com produção do quadro da pneumonia.

Entre estas, conseguimos assinalar a Salmonela, que acreditamos desempenhar um papel de importancia na etiologia da doença. São frequentes os casos de pneumonia pela associação estrita do virus á Salmonela. Observámos tambem um caso de doença espontanea, produzida seguramente pela associação do virus ao Alcaligenes.

A Pasteurela tem uma ação destacada como coadjuvante após o desenvolvimento de estados agudos provocados pelo Hemophilus; mas, ao que parece, póde, em determinadas condições, e quando associada ao virus, provocar o aparecimento de estados pneumonicos.

Outras bacterias comumente encontradas isoladamente, ou associadas a estas, não parecem ter um papel significativo.

Estas observações são interessantes porque parecem indicar até certo ponto a existencia de uma diversidade de propriedades entre o virus da pneumonia e os da influenza e gripe dos leitões.

## TRANSMISSÃO A ANIMAIS DE LABORATORIO

As experiencias de transmissão da doença foram feitas em camondongos, cobaias e coelhos.

Tentámos varias vezes a infecção desses animais com o virus e o Hemophilus isolados ou associados.

O Hemophilus isolado não se mostrou patogenico para camondongos. Animais injetados subcutaneamente ou por via intraperitonial com 5 cc. de uma emulsão em agua fisiologica de bacterias obtidas de cultura em agar-sangue, de 24 horas, permaneceram vivos sem demonstrar, quando necropsiados, quaesquer alterações. A tentativa de infecção por instilação nasal decorreu tambem sem resultados.

O camondongo demonstrou no entanto ser sensivel á infecção pelo virus. A instilação nasal do filtrado produziu neste animal alterações pneumonicas, visiveis sómente ao exame histologico, quando o virus agiu isoladamente, ou perceptiveis macroscopicamente quando houve uma associação do virus a bacterias existentes normalmente nas vias respiratorias.

Na primeira passagem o numero de animais infectados foi pequeno, porém a doença do camondongo é transmissivel em série: o virus, depois de adatado a este animal, tornou-se aos poucos mais patogenico, a ponto de termos obtido porcentagens altas de animais infectados.

A associação do virus ao Hemophilus, não apresentou uma ação diferente á obtida com o virus isolado.

Conseguimos transmitir a doença á cobaia. Neste animal a transmissão do virus por instilação nasal revestiu-se de caracteristicas interessantes. Agindo isoladamente, o virus produziu alterações muito discretas. A associação do virus ao Hemophilus, no entanto, determinou ora estados congestivos e hemorragicos agudos do pulmão, levando rapidamente á morte, ora estados pneumonicos, interessando principalmente os lóbos apicais. A instilação nasal de culturas do Hemophilus produziu em alguns casos o aparecimento de pequenos fócos inflamatorios peribronquiais.

Experiencias de transmissão da doença a coelhos resultaram negativas.

## CONCLUSÕES

Nossas pesquisas permitem-nos concluir que a pneumonia dos suinos que ocorre muito frequentemente em S. Paulo póde ser identificada com a gripe dos leitões descrita por Köbe.

Conseguimos estabelecer que além de um germen do genero *Hæmophilus*, outras bacterias como Bact. alkaligenes e principalmente as Salmonelas podem se associar ao virus experimental ou e x p o n t a n e a m e n t e, dando lugar a graves processos pneumonicos.

As cobaias e os camondongos são sensiveis ao virus.

## AETIOLOGY OF CONTAGIOUS HOG-PNEUMONIA

### *Abstract*

*Infectious pneumonia of swines, frequently occurring in São Paulo, is produced by the association of a filtrable virus with a bacteria.*

*A certain germ of the Hæmophilus genus was found which plays an important role as an associate of the virus. Also other bacteria as Salmonellas, Bact. alkaligenes, but above all those of Salmonella group, produced serious pneumonias spontaneously as well as experimentally when associated to the virus.*

*The illness can be identified with the «grippe» of sucking hogs described by* Köbe.

*Mice and guinea-pigs are sensible to the virus. In guinea pigs the association of the virus plus Hæmophilus produces marked alterations of the lungs. Only very slight lesions were observed in these animals when the virus alone was instillated.*


## BIBLIOGRAFIA


1 — Bueno, P. — 1938 — Sobre a histopatologia da broncopneumonia contagiosa dos suinos. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 9, 303-312.

2 — Kirchenbauer, H. — 1933 — *Z. Infkrkh. Haustiere,* 45, (Não consultado).

3 — Köbe, K. — 1933 — Die Aetiologie der Ferkelgrippe. *Zbl. f. Bakter.,* **129,** 161-176.

4 — Lewis, P. and Shope, R. — 1931 — Swine Influenza. *J. of Exper. Med.,* **54,** 361-371.

5 — Mc Bryde, C. N., Niles, W. B. and Moskey, H. E. — 1928 — *J. Am. Vet. Med. Assoc.,* **26,** 331.

6 — Scott, J. P. — 1938 — Swine Influenza. *XIII th. International Veterinary Congress.*

7 — Shope, R. — 1931 — Swine Influenza. *J. of Exper. Med.,* **54,** 349-359.

8 — Shope, R. — 1931 — Swine Influenza. *J. of Exper. Med.,* **54,** 373-385.

9 — Shope, R. — 1936 — The influenzas of swine and man. *The Harvey Lectures,* 183.

10 — Waldmann, O. — 1933 — Die Aetiologie des Ferkelkümmerns. Die Ferkelgrippe. *B. T. W.,* 49, 693-697.

Vol. 10 — Art. 19 Dezembro de 1939

# ALTERAÇÕES HISTOLOGICAS DO PULMÃO EM FACE DO VIRUS DA PNEUMONIA CONTAGIOSA DOS SUINOS

POR

P. Bueno

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 1 figura no texto e estampas 34-38

Os resultados de nossas experiencias (2) e as pesquisas de outros autores (8, 9, 10) demonstram que o virus das pneumonias infecciosas dos suinos é, por si só, capaz de produzir alterações pulmonares.

Nossas pesquisas referem-se a 17 casos de infecção experimental pelo filtrado e a numerosos casos espontaneos.

As infecções foram obtidas em maior numero e com maior exito por instilação nasal do material infectante. Este foi sempre obtido, por filtração em velas Berkefeld, de uma emulsão (em agua fisiologica) de extrato de pulmão doente.

Os animais foram sacrificados em periodos diversos da doença. Nos casos aqui estudados não foram isoladas bacterias, podendo-se portanto incriminar o filtrado como agente unico das alterações.

Descrevemos aqui as lesões encontradas em casos de infecção pura pelo virus e em seguida as alterações obtidas pela infecção dupla, isto é, do virus associado a bacterias.

## ALTERAÇÕES PRODUZIDAS PELO VIRUS

A infecção pelo virus produz, como já referimos, ligeiras alterações visiveis macroscopicamente. O pulmão mostra em geral uma nitida atelectasia e uma coloração rosea levemente pardacenta. A superficie de córte é aparentemente normal e os bronquios não contêm exudato.

Nos estados iniciais encontrámos muito nitida tumefação e vermelhidão dos ganglios linfaticos para-aorticos, bronquiais e mediastinais. A superficie de córte tem aspecto humido.

O exame microscopico revelou sempre, no pulmão, intensos fenomenos de irritação inflamatoria. As alterações que encontrámos em animais infectados alguns dias antes, traduzem-se por fórte proliferação de celulas histiocitarias nas paredes dos alveolos e nos septos conjuntivos, que se mostram fortemente espessados. Com o decorrer do processo é notavel a proliferação celular e frequente a formação de áreas de atelectasia (estampa 35, fig. *D*).

A estes primeiros fenomenos inflamatorios sucede o aparecimento de um denso manto linfocitario peribronquiolar, que em alguns casos é grandemente desenvolvido (estampa 35, fig. *E*). Em alguns casos observámos muito nitida infiltração linfocitaria em torno de algumas arteriolas.

Uma particularidade digna de nota é o termos encontrado, muito frequentemente, leucocitos eosinofilos fazendo parte do processo inflamatorio.

Esta alteração não é descrita por outros autores. SCHMIDT refere o encontro de eosinofilos na bronquite infecciosa dos cavalos e ao mesmo tempo menciona a negatividade da pesquisa em outras especies animais. A presença de vermes naturalmente deveria ser levada em consideração, porém, em nossas observações pudémos afastar totalmente a possibilidade de infestação por larvas de *Ascaris* ou *Metastrongilos*. Além do mais, os eosinofilos, nestes casos, não apareciam intensamente distribuidos, como na verminose pulmonar. O numero era menor e eles mostravam-se algumas vezes bem distantes da parede bronquial, no interior dos capilares, ou infiltrando os septos.

As alterações bronquiolares eram, em todos os casos estudados, muito discretas. Em casos mais antigos assinalámos sempre um pequeno exudato bronquial constituido por celulas epiteliais descamadas e raros leucocitos (estampa 35, fig. *E*).

A tumefação e vermelhidão dos ganglios linfaticos é traduzida histologicamente por uma nitida ativação e tumefação do reticulo-endotelio, hiperplasia do tecido linfoide, e forte hiperemia cortical. A infiltração por eosinofilos é frequente e algumas vezes intensa.

A questão da cura dos processos inflamatorios no pulmão é discutivel. SCHMIDT (8) refere que na gripe dos leitões, na falta de uma infecção bacteriana secundaria, dá-se depois de alguma tempo a «restitutio ad integrum» ou seja a regressão total das alterações. Nos casos experimentais, não tivemos oportunidade de observar uma cura, talvez por não deixarmos prolongar por muito tempo o periodo da doença. Na pratica observam-se curas clinicas e mesmo desaparecimento total da lesão. Entretanto devemos estabelecer que uma generalização, ou por outra, afirmação categorica de que sempre que não se dê uma infecção secundaria, haja cura, não está de acordo com o que observámos. Pudémos estabelecer que muito frequentemente ha persistencia das alterações, independentemente de uma infecção secundaria.

As lesões descritas por SCHMIDT na gripe dos leitões são muito semelhantes. Macroscopicamente, entretanto, não ha alteração visivel, a não ser tumefação dos ganglios linfaticos. O exame microscopico revela proliferação linfocitaria e histiocitaria no tecido peribronquial. Não ha processo inflamatorio endobronquial. Não é encontrada a infiltração eosinofilica no tecido pulmonar, nem nos ganglios linfaticos.

Segundo SHOPE (9), o virus da influenza produz, mesmo agindo isoladamente, alterações basicamente identicas ás observadas na molestia de associação, porém de menor intensidade. Pela infecção pura com o virus ha tumefação dos ganglios linfaticos bronquiais e do pescoço, e atelectasia pulmonar.

As alterações histologicas constam, segundo SHOPE e SCHMIDT, de um processo de endobronquite, acompanhado de peribronquite. Ha tambem proliferação de elementos histiocitarios.

SCHMIDT acredita que a peribronquite é a primeira reação morfologica consequente á entrada do virus no pulmão. A doença do filtrado seria então representada pela inflamação bronquiolar acompanhada de peribronquite e atelectasia.

## ALTERAÇÕES HISTOLOGICAS DESENVOLVIDAS PELA INFECÇÃO DUPLA

A associação do virus a bacterias determina o desenvolvimento de alterações pulmonares com o quadro caracteristico da broncopneumonia.

Os casos experimentais permitiram-nos chegar á conclusão de que o quadro produzido pela associação do virus ao Hemophilus é em parte diverso do processo encontrado nos casos em que ha outra associação microbiana. Nem uma unica vez conseguimos isolar o Hemophilus em cultura pura, porém em alguns casos a associação era com bacterias incapazes de intervir nos processos inflamatorios.

As alterações encontradas macroscopicamente limitam-se em geral aos lóbos apical e médio e a parte do posterior (estampa 34, fig. *A*) de ambos os pulmões, mas não raras vezes vimos disseminação do processo a grande parte do lóbo posterior. Não encontrámos alterações limitadas sómente ao pulmão direito, mas, em geral, lesões aí mais acentuadas.

Nos casos recentes o aspecto observado foi sempre de uma broncopneumonia catarral purulenta associada, nas formas crónicas, a áreas de induração.

Descreveremos isoladamente as alterações histologicas bronquiais e as do parenquima.

A l t e r a ç õ e s   b r o n q u i a i s — Nos bronquios constatámos, de inicio, descamação epitelial com frequente desenvolvimento de ulcerações, chegando não raro à ruptura da parede. As celulas descamadas lógo se incham, sofrem degeneração gordurosa, e com o decorrer do processo são substituidas por grande quantidade de leucocitos polimorfonucleares e por pequena quantidade de exudato seroso. Em diversos casos vimos, de inicio, aparecimento de mononucleares.

A mucosa mostrou-se, algumas vezes, séde de pequena infiltração leucocitaria, com edema da submucosa e, nos estados crónicos, com proliferação do epitelio.

A l t e r a ç õ e s   p a r e n q u i m a t o s a s — O tecido peribronquial mostra, desde o inicio, densos acumulos de linfocitos, dando origem, não raro, a foliculos linfoides. Verificámos tambem, frequentemente, a infiltração eosinofilica. Os fenomenos que observámos nos bronquios repetem-se: de inicio, tumefação e descamação das celulas epiteliais, que sofrem mais tarde degeneração gordurosa. Aos poucos desenvolve-se infiltração por mononucleares os quais, por fim, são substituidos por polimorfonucleares que aparecem espalhados ou constituindo pequenos acumulos em fórma de microabcessos. (Muitas vezes assinálamos mesmo em casos recentes, a inexistencia de mononucleares no exudato inflamatorio). Ao lado destes elementos encontrámos, em algumas áreas, pequena exudação serosa e, em fases mais adiantadas, depositos de fibrina.

Com o decorrer do tempo os processos inflamatorios regridem, dando lugar a estados mais crónicos caracterizados pela proliferação conjuntiva. Os septos, a principio espessados pelo desenvolvimento de edema inflamatorio, são em seguida invadidos por celulas conjuntivas proliferadas.

Esses processos inflamatorios não seguem o mesmo curso em todo o orgão: deparam-se sinais de inflamação aguda ao lado de outros indicando alterações inflamatorias mais antigas, que nunca chegam á cura completa.

Nas fórmas crónicas por associação de bacterias de infecção secundaria *(Streptococus, B. pyogenes)*, verificámos, em alguns casos, o desenvolvimento de abcessos e de fócos de necrose, localizados de preferencia nas porções anteriores do pulmão.

Processos com caracteristicas histologicas um tanto diversas das descritas foram observadas pela associação estrita do virus ao Hemophilus: o exudato inflamatorio era puramente mononuclear, e constituido por linfocitos, monocitos, plasmacelulas e celulas epiteliais descamadas (est. 36, fig. *F*). Em alguns casos vimos acentuado desenvolvimento de um edema mucoso e de necrose fibrinoide das paredes alveolares (est. 36, fig. *G*). Ao lado da infiltração eosinofilica, estas alterações constituem nitido substrato morfologico de uma reação alergica. Conseguimos estabelecer que nesses casos os processos de cura sobrevêm muito mais rapidamente do que nos em que ha outra associação bacteriana.

E' de interesse, como demonstrámos, o estudo da natureza dos elementos inflamatorios que tomam parte no processo. A associação do virus ao Hemophilus dá desenvolvimento a um quadro que póde ser facilmente diferenciado das alterações produzidas pela reunião do virus a outras bacterias. O exudato mononuclear é caracteristico do primeiro tipo de associação (est. 36, fig. *F*). Diferentes, são os caracteristicos do exudato inflamatorio em outros casos (p. ex.: virus e Alcaligenes). Aqui o exudato é constituido sómente por celulas epiteliais descamadas e leucocitos polimorfonucleares (est. 37, fig. *H*). Pela associação do virus á Salmonela, notámos sómente infiltração de celulas de caracter histiocitario (est. 37, fig. *I*).

O estabelecimento destas caracteristicas é de grande interesse para a demonstração e prova de que outros germens, além do Hemophilus, são capazes de se associar ao virus, dando desenvolvimento ás alterações de broncopneumonia.

SHOPE, descreve, na influenza dos porcos, alterações muito semelhantes ás que referimos. No entanto assinala que pela associação do virus ao Hemophilus ha aparecimento de um exsudato bronquial constituido por leucocitos polimorfonucleares e celulas epiteliais descamadas. Não se refere á infiltração monuclear no parenquima. O encontro de mononucleares juntamente com polinucleares e celulas descamadas é descrito por SCHMIDT (8) e KREMBS (7) como regra, em casos da gripe dos leitões. Esses autores não assinalam, no entanto, o aparecimento de um exsudato puramente mononuclear.

Os achados de SHOPE, em estudos sobre a influenza dos porcos, de SCHMIDT e KREMBS na gripe dos leitões, e nossas observações, reve-

lam a existencia de uma identidade entre essas molestias; mas, de acordo com a opinião dos autores alemães, é de supor uma diferença de patogenicidade entre os diversos virus.

E' de interesse o conhecimento do m o d o d e a ç ã o do virus no organismo.

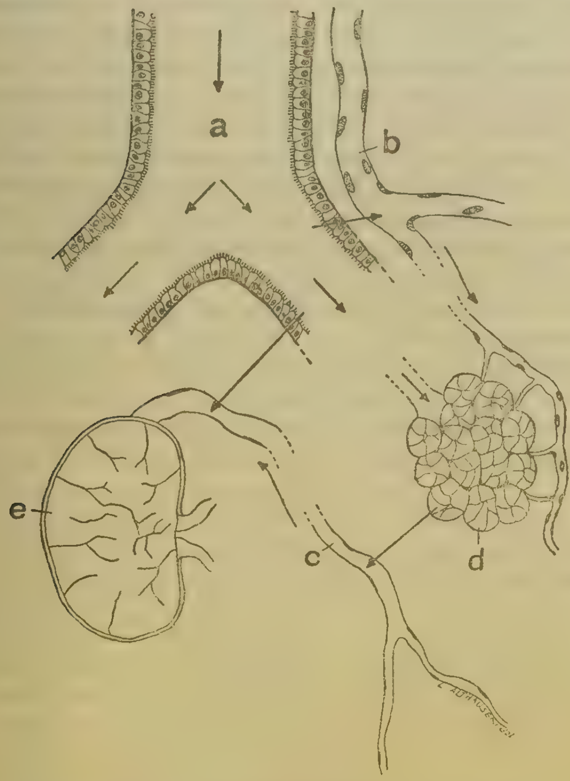



Fig. 1 — Representa esquematicamente o modo pelo qual se daria a infecção, segundo as indicações obtidas pelos achados histologicos. a - representa um segmento de bronquio; b - vaso sanguineo; c - vaso linfatico; d - alveolo; e - ganglio linfatico.

Estabelecemos que no desenvolvimento do quadro da pneumonia tem papel principal um virus filtravel que sensibiliza o pulmão perante determinadas bacterias (2). A ação conjunta desses dois agentes constituiria o estado suficiente para o desenvolvimento das alterações pulmonares caracteristicas da doença.

O modo de difusão, não só do virus, mas tambem das bacterias, póde ser com alguma certeza esclarecida pelas pesquisas histologicas.

A primeira reação do tecido pulmonar perante o virus é a proliferação histiocitaria. Em animais nascidos em locais infectados, e mortos 72 horas após, encontrámos, na quasi totalidade dos casos, aquelas alterações indicando já a presença do virus no pulmão. Não só essas observações, mas outras, em que foi feito o isolamento dos leitões com uma hora de vida e que posteriormente mostraram sinais tipicos da doença, demonstram a extrema capacidade de infecção e de difusão do virus. Dada a sua regularidade e a sua rapidez de formação, as alterações histologicas demonstram que após a penetração por via nasal o virus invade rapidamente as porções aereas superiores e atinge os bronquios, caíndo na corrente sanguinea em seguida á passagem atravez do epitelio bronquial. Só a disseminação pela via sanguinea explicaria a regularidade de distribuição das alterações em todo o pulmão.

A via linfatica tem possivelmente um papel secundario na difusão inicial do virus.

O caminho endobronquial seria de importancia na difusão do virus, o que é demonstrado pela existencia de proliferações linfocitarias peribronquiolares; no entanto, talvez o papel mais importante desta via seja a da disseminação bacteriana, secundaria á ação do virus (fig. 1).

## A DOENÇA DOS ANIMAIS DE EXPERIENCIA

Camondongos — A passsagem do virus do porco para o camondongo foi por nós obtida, confirmando observações de outros autores (SHOPE (10), FERTIG (3) e SCHMIDT (8)). Póde-se obter a infecção por instilação de filtrado de extrato (2 ou 3 gotas) de pulmão de porco nas fossas nasais de camondongos previamente anestesiados. A principio os resultados não são muito regulares; entretanto a doença do camondongo é, como a do porco, transmissivel em série, e após algumas passagens o virus torna-se mais patogenico, chegando-se á obtenção de uma porcentagem elevada de animais infectados.

Examinámos as alterações pulmonares de animais com 8, 15 e 25 dias de doença e em diversas passagens. Em diversos animais o virus causa, agindo isoladamente, alterações discretas, visiveis sómente ao exame microscopico. Em outros casos, porém, ao virus se associam bacterias existentes normalmente no trato respiratorio, com consequente desenvolvimento de uma pneumonia lobar, atingindo um ou mais lóbos e prosseguindo depois lentamente.

A infecção pelo virus isolado conduz ao desenvolvimento de uma proliferação linfocitaria peribronquiolar.

As alterações ocasionadas pela associação do virus a bacterias (estampa 38, fig. /) eram traduzidas histologicamente, nas formas iniciais, por fórte pneumonia descamativa. As celulas do epitelio alveolar, fortemente tumefactas, descamam para o interior dos alveolos. Com o decorrer do processo verificámos fórte infiltração leucocitaria e por fim proliferação conjuntiva. Em geral ha bronquite purulenta. Os bronquiolos contêm leucocitos polimorfonucleares, celulas epiteliais descamadas e pequena quantidade de exudato seroso. Frequentemente constatámos fórte irritação das celulas do epitelio bronquial, que proliferam e tornam-se muito altas e por fim descamam e degeneram. Os processos de peribronquite representados por acumulos linfocitarios em torno dos bronquiolos são frequentes, e em diversos casos encontrámos proliferações linfoides em torno de pequenos vasos.

Fertig acredita que estas reações linfocitarias perivasculares no pulmão de camondongos constituem encontro normal. Entretanto, em grande numero de animais testemunhas, que examinámos, não encontrámos alterações identicas. A's vezes ha pequeno acumulo de linfocitos em torno dos pequenos vasos; são porém infiltrações extremamente discretas, incapazes de confundir-se com as observadas na infecção pelo virus.

Shope (9) e Schmidt, Andrewes e Laidlaw (12), encontram em camondongos infectados pelo virus da influenza, bronquite, edema peribronquial e perivascular e exudato leucocitario.

Fertig assinala o encontro de proliferações linfocitarias peribronquiais e, ás vezes, de pequeno catarro bronquial desenvolvido pela ação do virus da gripe. Pela associação do virus a bacterias, encontra peribronquite e alterações pneumonicas.

Cobaias — Provámos ser possivel a transmissão da doença a cobaias, fáto ainda não observado. A passagem da doença a esses animais reveste-se de um caracter bem interessante, pela necessidade da associação do virus ao Hemophilus, como no porco, para que se dê o desenvolvimento de um quadro significativo.

Cobaias em grupos de 15 e aproximadamente de 150 grs. de peso foram infectadas com o virus isolado, com o Hemophilus isolado em cultura pura e com o virus associado ao Hemophilus. Usámos sempre a técnica de instilação nasal, após anestesia, de 1 cc. de material infectante. Para confirmação dos resultados fizemos por fim injeções intratraqueais. Os resultados foram sempre concordantes.

A infecção pelo virus isolado produz sómente alterações discretas. Proliferações linfoides em torno dos bronquiolos e capilares, no pulmão de cobaias normais, constituem achado mais ou menos frequente e já

foram mesmo descritas como normais (GERLACH u. FINKELDEY (4)). Em cobaias infectadas pelo virus, estas proliferações são no entanto fortemente acentuadas e associadas a uma nitida proliferação histiocitaria do parenquima circundante. Acreditamos constituirem essas alterações inflamatorias, uma reação do tecido em face do virus.

O Hemophilus isolado é capaz de determinar, si bem que muito irregularmente, o aparecimento de pequenos fócos broncopneumonicos, visiveis macroscopicamente. O exame histologico revela nesses fócos, de inicio, pequena descamação epitelial e por fim proliferação conjuntiva, com nitidas proliferações linfoides em torno de capilares e bronquiolos.

As cobaias infectadas por instilação nasal de virus e Hemophilus, associados, não raras vezes morreram 2 ou 3 dias após, com fórtes processos congestivos e hemorragicos nos pulmões (est. 34, fig. *B*). As que sobreviveram mostraram quasi sempre, depois de alguns dias, pneumonia lobar atingindo, em geral, as porções apicais (est. 34, fig. *C*). O exame histologico revelou, nos estados iniciais, hiperemia e fórte descamação do epitelio alveolar e bronquial e muitas vezes destruição da parede bronquiolar. Em casos mais antigos vimos muito acentuada proliferação linfoide em torno de capilares e bronquiolos, e a reação do parenquima era representada pela proliferação histiocitaria (est. 38, fig. *K*). Esses processos, ao que parece, podem por fim regredir.

Dada a negatividade das pesquisas bacteriologicas do Hemophilus, é de supôr o desaparecimento do germen imediatamente após o desenvolvimento dos estados inflamatorios iniciais.

## HISTOLOGICAL ALTERATIONS OF THE LUNGS PRODUCED BY THE VIRUS OF CONTAGIOUS HOG-PNEUMONIA

### *Abstract*

*The alterations produced by the virus of hog pneumonia alone, are microscopically caracterised by peribronchial proliferations of lymphocytes and by the proliferations of histiocytes in the parenchyma. Very frequently we find an infiltration by eosinophiles in the parenchyma of the lungs, mainly in the peribronchial spaces. This accumulation of eosinophiles is produced by the virus without any doubt. These alterations frequently persist in adult animals, independently of secundary infections.*

*The reaction of the lymphoid glands consists in a considerable proliferations of reticular cells, hyperplasia of the lymphoid tissue and an eosinophil infiltration.*

*The association of the virus with certain bacteria produces a pneumonia with histological characteristics differing according the nature of the associated bacteria. When the virus is associated with the Hæmophilus, the inflammatory cell infiltration consists exclusively in mononuclears. By the association of the virus with a Salmonella an exsudate of a histiocellular character is to be observed. On the other side the association of the virus with the Bact. alkaligenes produces an exsudate with cells exclusively of the polymorphonuclear caracter intermixed with desquameted epithelial cells.*

*In guinea pigs experimentally infected by an association of the virus with the Hæmophilus, the lesions developed are generally localised in the apical lobes. Microscopically epithelial desquamations are to be seen, with a heavy lymphocytarian infiltration of a peribronchial and periarterial localisation and by a proliferation of the histiocytic cells in the parenchyme.*

*In mice, the pure virus infection is represented only by peribronchial infiltration with lymphocytes. Bacteria existind in the respiratory tract acting with the virus may result in a lobar pneumonia; this develops primarily in the azygos lobe, but afterwards spreads to other regions of the lungs. This process histologically consists in a desquamation of the brochial and alveolar epithelium, in a heavy infiltration of the parenchyme by leucocytes, and in a purulent bronchitis with marked lymphoid proliferations around both the bronchioles and mainly around the small arteries. These lymphoid proliferations are much more marked those found in normal animals.*

## BIBLIOGRAFIA

1 — Bueno, P. — 1938 — Sobre a histopatologia da broncopneumonia contagiosa dos suinos. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, **9**, 303-312.

2 — Bueno, P. — 1939 — Etiologia da pneumonia contagiosa dos suinos. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, **10**, 279-289.

3 — Fertig, H. — 1935 — Inaug-Diss. Hannover. Cit. Schmidt.

4 — Gerlach u. Finkeldey — 1926 — Krankheitsforschung, 4, Cit. Grieshammer.

5 — Grieshammer, — 1938 — Über Lungenentzündung bei Meerschweinchen mit vergleichenden Untersuchungen in bezug auf die Grippepneumonie des Menschen. — *Arch. f. Hyg. u. Bakter.*, **121**, 102-103.

6 — Köbe, K. — 1936 — Vergleichende Untersuchungen über die pneumotropen Virusarten und die durch sie bedingten Krankheiten bei Mensch und Tier. *Arch. Tierheilk.*, **71**, 149-181.

7 — Krembs, J. — 1938 — Histopathologie der Ferkelgrippe. *Arch. Tierheilk.*, **73**, 387-398.

8 — Schmidt, W. — 1935 — Vergleichende Untersuchungen zur Pathologie pneumotroper Virusarten. *Arch. Tierheilk.*, **70**, 1-22.

9 — Shope, R. — 1931 — Swine Influenza. *J. of Exper. Med.*, **54**, 349-359.

10 — SHOPE, R. — 1935 — The infection of mice with swine influenza virus. *J. Exper. Med.*, 62, 562-572.

11 — SHOPE, R. — 1936 — The influenzas of swine and man. *The Harvey Lectures.* 183-213.

12 — SMITH, ANDREWES and LAIDLAW — 1934 — The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza. *Lancet,* 859-862.

## EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

### Estampa 34

Fig. A — Leitão - Pulmão — Alterações inflamatorias localizadas nas porções anteriores.

Fig. B — Cobaia - Pulmão — Doença experimental — Processos congestivos e fórtes hemorragias.

Fig. C — Cobaia - Pulmão — Doença experimental — Pneumonia dos lóbos apicais.

### Estampa 35

Fig. D — Leitão - Pulmão — Intensa proliferação histiocitaria no parenquima.

Fig. E — Leitão - Pulmão — Proliferação linfoide peribronquiolar.

### Estampa 36

Fig. F — Leitão - Pulmão — Exudato constituido por mononucleares e celulas epiteliais descamadas (virus e Hemophilus.)

Fig. G — Leitão - Pulmão — Edema mucoso. Necrose fibrinoide.

### Estampa 37

Fig. H — Leitão - Pulmão — Exudato constituido por leucocitos polimorfonucleares e celulas epiteliais descamadas (virus e Alcaligenes).

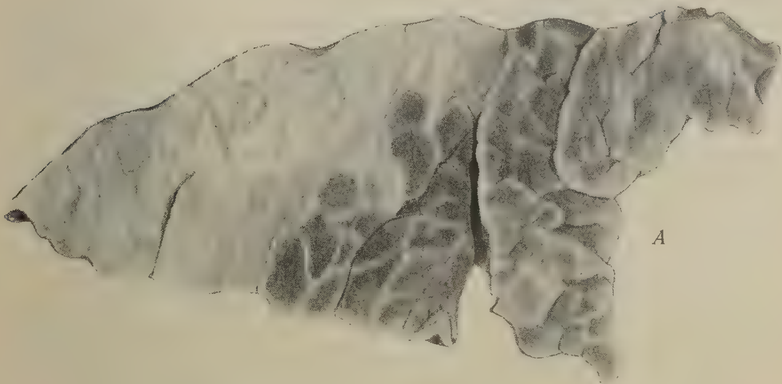
Fig. I — Leitão - Pulmão — Exsudato constituido por celulas de caracter histiocitario (virus e Salmonela).

### Estampa 38

Fig. J — Camondongo - Pulmão — Bronquite purulenta — Peribronquite.

Fig. K — Cobaia - Pulmão — Avançada proliferação linfoide em torno de bronquiolos e capilares. Proliferação histiocitaria no parenquima.

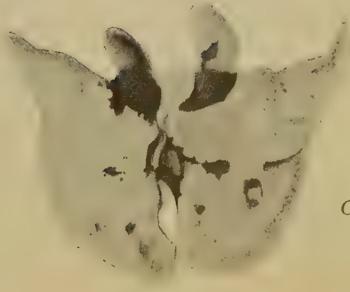
Estampa 34



A

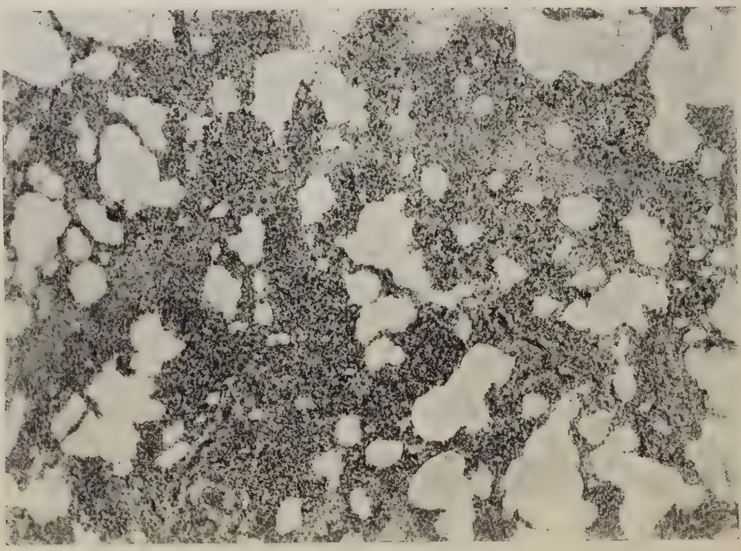


B

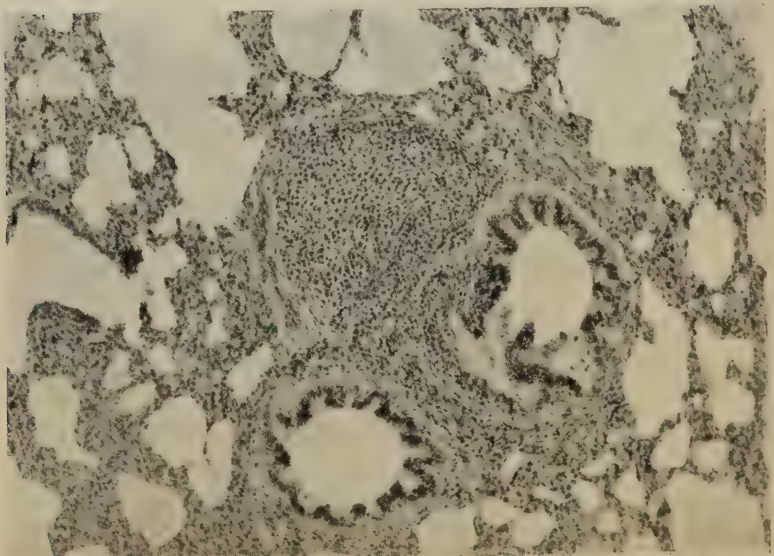


C

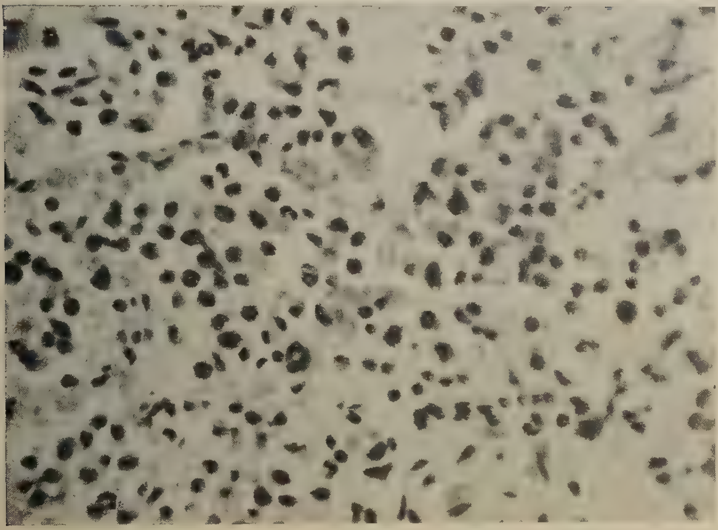
*L. Althausen, del.*



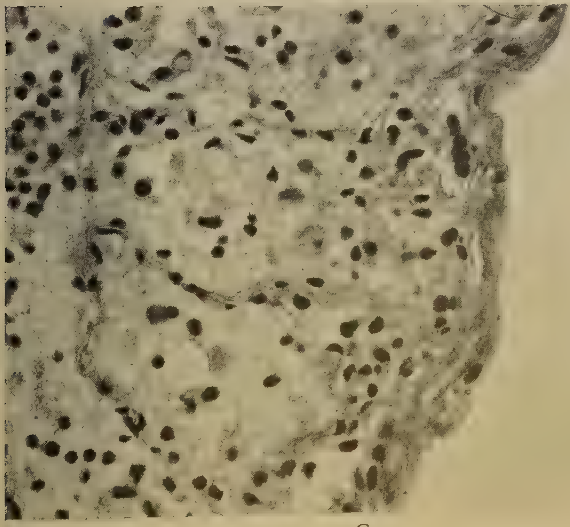
D



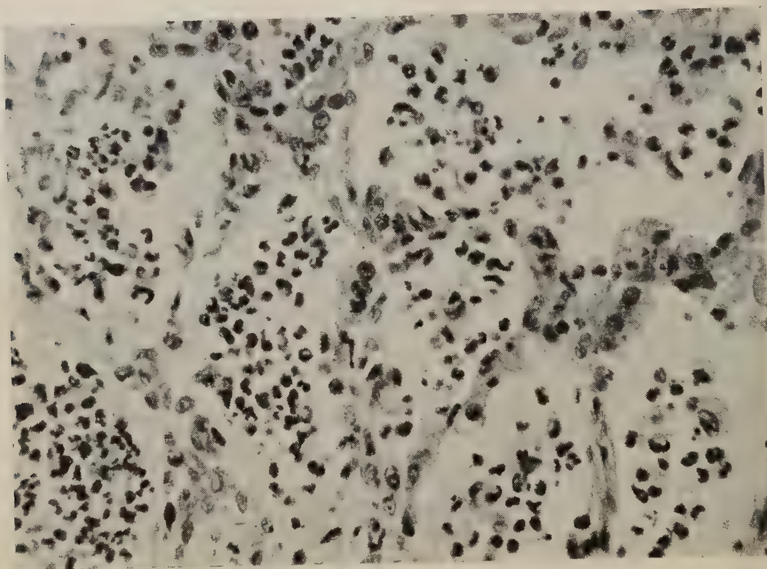
E



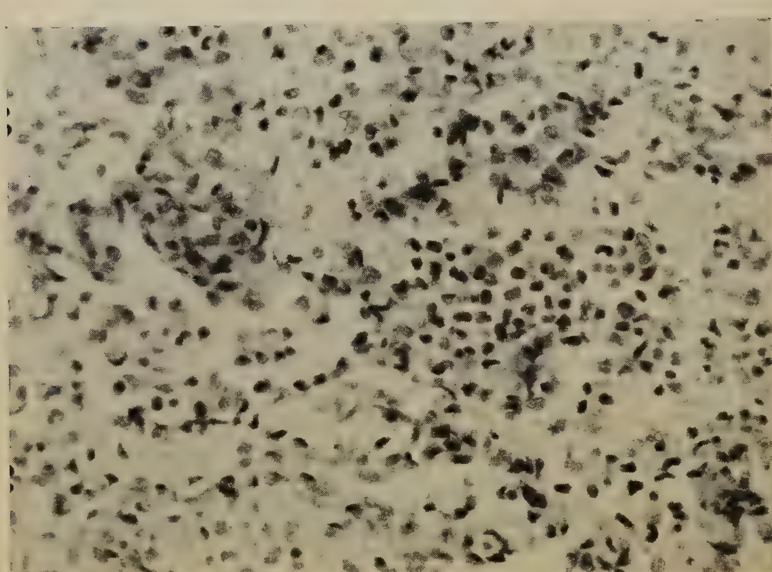
*F*



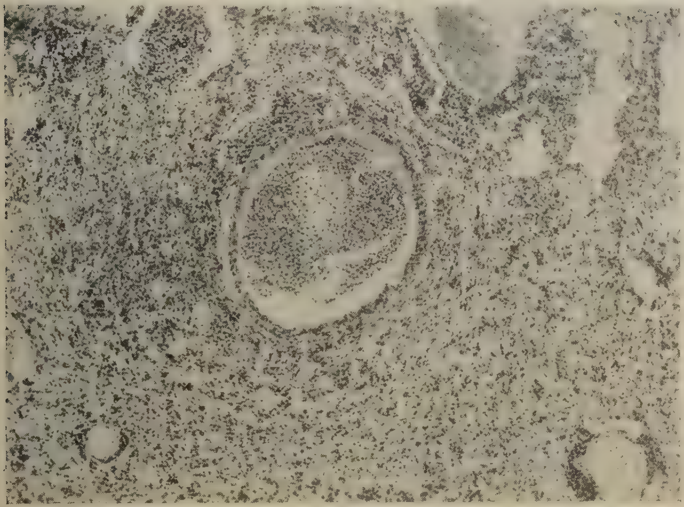
*G*



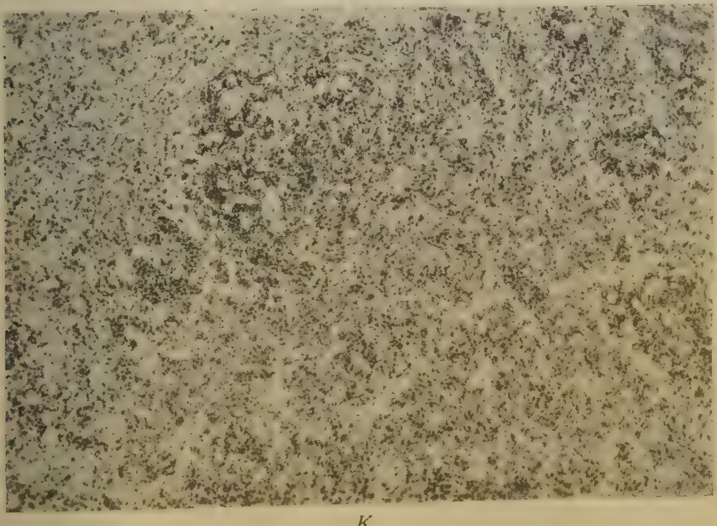
*H*



*I*



*J*



*K*

Vol. 10 — Art. 20 Dezembro de 1939

# DURAÇÃO DA IMUNIDADE CONFERIDA POR INJEÇÕES SIMULTANEAS DE "PASTEURELLA AVICIDA" E SULFANILAMIDA

POR

J. Reis

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Em trabalho anteriormente publicado, NOBREGA e REIS descreveram método eficiente de imunizar contra a cólera aviaria, pela inoculação de variante azul, experimentalmente obtida, de *Pasteurella avicida.* A imunidade desse modo conseguida é de elevado grau, mas apresenta o inconveniente de ser fugaz, desaparecendo ao fim de quatro mêses.

Em seu trabalho sobre a ação da sulfanilamida na cólera experimental, CARDOSO, NOBREGA e REIS referem estabelecimento de imunidade após injeções simultaneas de sulfanilamida e *P. avicida.* Tais verificações sugerem, sem duvida, a possibilidade de se obter, por esse modo, imunidade de maior duração.

O presente trabalho tem por fim esclarecer este ponto, assim como discutir as possibilidades desse modo de vacinação relativamente ao descrito por NOBREGA e REIS.

## MATERIAL E MÉTODOS

A sulfanilamida foi usada em suspensão oleosa (oleo de amendoim) a 20 %, em injeção intramuscular, na dose de 1 - 2 mgrs. por grama de peso vivo.

A *Pasteurella avicida* foi inoculada tambem intramuscularmente, consistindo o inóculo em 1 cc. de diluição a 1:1000, em agua fisiológica, de cultura — caldo de 24 hs. de amostra fluorescente de *P. avicida.* Para provar a imunidade, usamos tambem amostra fluorescente de *P. avicida,* de cultura em caldo de 24 hs.

## RESULTADOS

D u r a ç ã o d e i m u n i d a d e — Oito frangos Leghorn brancos, de peso médio 950 grs., recebem no lado esquerdo 8 cc. de suspensão a 20 % de sulfanilamida e no lado direito 1 cc. de pasteurela. Seis mêses depois são inoculados com nova dose de pasteurela: dois recebem 1 cc. de diluição a 1 %; quatro, 1 cc. de diluição a 1:1000 e dois, 1 cc. de diluição a 1:2000, dóses a que seguramente resistem frangos inoculados com pasteurela 15 dias após o tratamento imunizante.

Nenhum deles resiste á infecção, morrendo todos tão depressa como 8 controles inoculados com as mesmas doses de pasteurela.

Assim, pois, a inoculação simultanea de sulfanilamida e amostra virulenta não oferece, do ponto de vista da imunidade, melhores perspectivas que a vacinação por meio de amostra azul artificialmente obtida em laboratorio. Apresenta, pelo contrario, a desvantagem de ser perigosa, porquanto a amostra injetada é altamente virulenta e capaz de se disseminar rapidamente pela criação. E' preciso lembrar que das galinhas tratadas pela sulfanilamida mais pasteurela, algumas sucumbem com infecção tipica e constituem, portanto, contratempo desagradavel como possiveis fontes de infecção para outras aves. Além disso, o grau de imunidade conferido por este processo parece menor que o assegurado pela vacina «azul», uma vez que esta protege solidamente contra doses elevadas de pasteurela fluorescente (0.1 cc. de cultura caldo de 24 hs.).

O combate eficaz á cólera deve continuar a basear-se, antes de tudo, em cuidadosa eliminação de portadores.

Eliminação do germe e reação geral à vacinação — Em geral as aves tratadas com dóse adequada de sulfanilamida e pasteurela não revelam reação apreciavel. Algumas, todavia, apresentam sintomas de doença e morrem. Raras são as que, depois de apresentar tais sintomas, conseguem recobrar a saude. Assim, em um lote de 17 aves inoculadas com 0.800 gr. de sulfanilamida e 1 cc. de pasteurela a 1:1000, apenas uma, das que desenvolvem sinais de infecção, consegue salvar-se; cinco morrem tardiamente.

Nas galinhas tratadas por sulfanilamida e pasteurela a reação no ponto de inoculação de pasteurela é praticamente nula quando elas não apresentam sinais apreciaveis de doença. Nesse caso, a pesquisa da pasteurela no ponto de inoculação cedo se revela negativa: em um frango isso aconteceu já ao fim de 9 dias: a ave foi sacrificada e os tecidos da zona de inoculação foram semeados em caldo.

Nas aves que a sulfanilamida não consegue proteger contra a infecção, desenvolve-se no ponto de inoculação a reação tipica (necrose extensa e profunda).

Nas aves que não apresentam sinal de molestia, geralmente não se encontra o germe nem nas fezes nem no muco: Em 17 frangos de 950 grs. que recebem 1,600 gr. de sulfanilamida mais pasteurela (P 265 a 1:1000), nenhuma revela a presença de germe no muco bucal, quando examinadas 40 dias após. De 11 galinhas inoculadas com a mesma dose de pasteurela, porém com dose menor de sulfanilamida

(0.800 grs.), uma se revela portadora, ainda quarenta e sete dias após, tendo-se porém espontaneamente esterilizado ao fim de 130 dias.

Estas observações mostram claramente que a possibilidade de se constituirem portadores após o tratamento pasteurela mais sulfanilamida, embóra rara, existe e não pode ser desprezada na prática.


## ON THE DURATION OF THE IMMUNITY FOLLOWING THE SIMULTANEOUS INJECTION OF "PASTEURELLA AVICIDA" AND SULFANILAMIDE INTO CHICKENS

### *Abstract*

*The possibility of conferring upon chickens a certain degree of immunity against fowl-cholera by the simultaneous injection of Pasteurella avicida and sulfanilamide has recently been shown by* CARDOSO, NOBREGA & REIS.

*In this paper the author shows that the duration of the immunity conferred by such way does not reach six months. In addition, one out of 28 chickens treated with Pasteurella + sulfanilamide became a «healthy carrier» of fowl-cholera.*

*Therefore, the sulfanilamide-Pasteurella treatment shoud not be recommended as a prophylactic means against fowl-cholera. This disease is to be fought mainly by the careful removal of the «healthy carriers» aided, when necessary, by the vaccination of the flock with the vaccine previously described by* NOBREGA *and* REIS.


## BIBLIOGRAFIA


CARDOSO, D. M., NOBREGA, P. e REIS, J. — 1938 — Ação da sulfanilamida sobre a infecção por «Pasteurella avicida» em aves. *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 9, 253-260.

NOBREGA, P. e REIS, J. — 1938 — Vacinação contra cólera aviaria com amostra viva (tipo azul) de «Pasteurella avicida», *Arq. Inst. Biologico*, S. Paulo, 9, 77-84.

Vol. 10 — Art. 21 Dezembro de 1939

# ANTICORPOS NEUTRALISANTES DO VIRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY EM SÔROS DE PORCOS NO BRASIL

POR

V. Carneiro

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Coube a SHOPE, do Instituto Rockefeller, em 1931, o merito de haver demonstrado pela primeira vez, que o sôro dos suinos que passaram por uma infecção produzida pelo virus da doença de Aujeszky, possue anticorpos neutralisantes do virus, postos em evidencia quando se realisa uma mistura virus-sôro e se inocula a animais sensiveis á infecção experimental, como a cobaia e o coelho.

As primeiras experiencias de SHOPE foram realizadas com o sôro de cobaias previamente infectadas por via subcutanea. Logo em seguida, ensaios são realizados com sôros de porcos convalescentes, inoculados pela mesma via e que depois de apresentarem um quadro atipico de uma infecção benigna, produzida pelo virus da doença isolado nos Estados Unidos, se restabeleceram. Estes primeiros ensaios foram realizados por inoculação das misturas na cobaia, por via subcutanea, e o autor americano assinala que com menores doses de virus e maiores doses de sôros, foi possivel obter igualmente misturas que eram completamente neutras para o coelho.

Mais tarde, continuando investigações sobre o mesmo assunto, SHOPE, (1935) vale-se da presença desses anticorpos especificos no sôro sanguineo, para verificar a presença da infecção em suinos em um fóco em que a doença havia sido notificada em bovinos. Dos seis sôros examinados, quatro neutralizam o virus de Aujeszky isolado nos Estados Unidos. Diante desses resultados, ensaios são procedidos com o objetivo de conhecer a presença desses anticorpos em sôros diversos, de porcos de varias procedencias: 8 sôros de porcos infectados experimentalmente, por diversas vias, com 8 resultados positivos; 23 sôros do comercio, contra a peste porcina, com 21 resultados positivos; 15 outros sôros de porcos nas mesmas condições, mas colhidos no laboratorio, com 13 resultados favoraveis; 10 sôros procedentes do Middle West, com resultados todos positivos e 10 outros sôros de porcos maiores, procedentes de zona onde a doença não era assinalada, com resultados todos negativos. Foram pois, examinados, ao todo, 63 sôros com 49 resultados positivos.

Verifica assim, o autor citado, por essa técnica de trabalho, que a infecção pode ser mais ou menos frequente em certas regiões dos Estados Unidos, passando ignorada, como infecção benigna. Esta conclusão está de acordo com o que se sabe hoje, sobre o carater todo especial que a doença de Aujeszky apresenta nos suinos, nos quais ela se mostra de regra, sem o prurido tipico que é, nas outras especies, a sua melhor caracteristica clinica e como infecção benigna, altamente contagiante e de baixo indice de mortalidade.

A pesquisa desses anticorpos no sôro de suinos é em seguida, realizada por alguns pesquisadores europeus, mas em geral, em animais inoculados experimentalmente e em pequeno numero de casos. Referencias neste sentido são feitas por Köves e Hirt (1934) e experiencias são relatadas por Manninger e Marcis (1937) por Hirt (1937) por Gerlach e Schweinburg (1936) e finalmente por Glover (1938), variando em detalhes a técnica de trabalho de cada um destes autores.

Em linhas gerais, as conclusões das investigações acima citadas não se afastam das que foram estabelecidas pelo pesquisador americano e todos são acordes na afirmativa de que os anticorpos existem e são especificos, na conclusão de que traduzem previa infecção pelo virus e na verificação de que os animais que sofreram uma infecção de peste porcina não revelam tais anticorpos, a menos que tenham passado, igualmente, por uma infecção produzida pelo virus de Aujeszky. O metodo serve, pois, ao diagnostico da infecção nos suinos, como processo especifico. Tais anticorpos não são, ainda, neutralizantes do virus rabico e quando obtidos de animais inoculados com o virus norte americano neutralizam o virus europeu isolado por Aujeszky.

Ensaios em maior escala, reunindo 50 sôros misturados, de 20 suinos, são realizados por Glover na Inglaterra, onde a doença não foi ainda identificada, mas parece existir, embora de modo muito raro. Não foi possivel revelar a presença dos referidos anticorpos nos sôros dos porcos inglezes.

* * *

A doença de Aujeszky surge no nosso meio sob a forma de focos episooticos dispersos, atingindo apenas os bovinos, mais raramente os ovinos, com série de casos ás vezes numerosos. Ela se mostra bem frequente no fóco brasileiro que é constituido, em linhas gerais, pela região do Brasil central compreendendo o Estado de S. Paulo, sul de Minas, sul de Goiaz, norte do Paraná e que se estende mesmo mais longe, em regiões mais distantes de Minas, do Estado do Rio, e provavelmente do Espirito Santo. Em S. Paulo sua frequencia é bem maior do que se supõe e para dar uma idéa neste sentido, parece sufi-

ciente assinalar que já isolamos aqui, 13 amostras de virus, procedentes de quasi todas as regiões do Estado e de zonas distantes umas das outras. Depois do trabalho inicial de Carini e Maciel (1912) nenhuma amostra de virus havia sido isolada no Estado. As duas outras amostras isoladas no Brasil foram a de Alves de Souza (1922) e a de Ortiz Patto (1932) sendo a primeira do Pomba e a segunda de Varginha, ambas de Minas Gerais.

A's vezes o numero de casos da doença é maior do que se supõe: entre outros exemplos neste sentido, podemos referir o de uma criação em S. Paulo, onde 19 casos se verificaram no espaço de cerca de um mês, em um efetivo de uma centena de cabeças, o que representa 20 % de prejuizos totais e rapidos na criação de bovinos.

Em publicação posterior, teremos ocasião de analisar certos aspetos particulares que a doença revela nesses fócos, reunindo observações de inqueritos locais numerosos, fornecendo dados acordes e por isso mesmo interessantes.

Julgamos que seria indicado, num país como o nosso, onde a doença surge com frequencia nos bovinos, determinar como se comportariam os sôros de porcos nacionais, em ensaios com o objetivo de procurar tais anticorpos, pela prova de proteção, no coelho e na cobaia. Seria este, certamente, um dos meios e, sob certos aspetos, o mais indicado, para verificar si, mesmo sem as manifestações clinicas claras, a infecção existiria nos suinos, no nosso meio, nos fócos e no momento em que os surtos ocorrem em bovinos. Releva notar que nenhum dos ensaios que acima referimos foi conduzido em tais condições, si excetuarmos alguns raros exames de Shope. São ainda em pequeno numero os nossos ensaios aqui relatados, mas a circunstancia de serem todos os sôros examinados, provenientes de fócos em que a doença ocorreu e de animais aí escolhidos, dá-lhes uma significação especial que queremos pôr em relevo.

Para iniciar este estudo, além de realizarmos a escolha de suinos existentes nas fazendas, nos fócos e no momento em que ondas episooticas eram assinaladas, os animais foram escolhidos depois de inqueritos locais com o objetivo de separar os individuos que pudessem apresentar maior interesse á investigação. Uma terceira precaução preliminar póde ser tomada em consideração nestes exames: a existencia de um surto episootico nos bovinos não ficou sujeita a uma probabilidade: um diagnostico clinico seguro foi fixado por nós, ou por alguns dos nossos colegas do Serviço de Defesa Animal, baseado na observação de casos, e uma confirmação foi realizada pelo isolamento do virus. Ao dr. C. Xavier, veterinario do Instituto, deixamos aqui os nossos

melhores agradecimentos pela notificação de alguns fócos e pelo excelente concurso na colheita de dados.

As experiencias foram feitas em quatro focos diversos e distantes uns dos outros, situados em Laranjal, Pirajú, Cravinhos e Gironda, sendo os dois primeiros na zona da Sorocabana e os outros dois na da Mogiana. Foram examinados 32 sôros de porcos.

A realização desses exames oferece dificuldades praticas que obrigam a certa morosidade, pois, é necessario aguardar o aparecimento dos fócos. Além disso, os ensaios de laboratorio foram retardados pela necessidade de sistematizar uma rotina de trabalho aplicavel ao nosso caso, diante de dificuldades novas surgidas; entre estas destaca-se a que resulta de uma ação patogenica irregular, inconstante e pouco acentuada de nossa amostra de virus usada nestes ensaios, para a cobaia quando inoculada por via subcutanea, além da que decorre de uma diferença de comportamento destas misturas virus-sôro, quando inoculadas na cobaia ou no coelho, não sendo de nenhum modo, sempre paralelos os resultados nestas duas especies animais. Estas questões serão mais tarde, examinadas em detalhe. Além disso, ensaios previos são necessarios no sentido de conhecer a DLM da amostra empregada, para o coelho e para a cobaia.

Técnica de Trabalho. Em linhas gerais, nossas experiencias são feitas segundo a técnica de SHOPE, que consiste em colocar uma emulsão de virus a 1p. 10, mesmo não centrifugada, nem filtrada, mas apenas libertadas das particulas grosseiras de substancia nervosa, na dose de 1 cc., correspondendo a 100 mg. de cerebro de coelho que sucumbiu á doença, realizada por via intracerebral, — em presença de 1 cc. - 0.5 - 0.1 de sôros de porcos. Sôros normais, provenientes de zonas onde não havia a doença, bem como sôros de animais que haviam sido inoculados de peste porcina, funcionaram como controles, depois de um exame previo revelar a ausencia de poder neutralizante. A mistura é mantida á temperatura ambiente pelo espaço de 30 minutos e depois conservada na geladeira a + 3°, durante cerca de 17 horas. Em geral, o material de virus usado é feito de cerebro de coelho conservado em glicerina fosfatada, de pH 7.2, durante horas ou dias, mas evitamos sistematicamente o uso do virus conservado mais de uma semana, fugindo a um possivel empobrecimento do material. As inoculações são feitas a principio no coelho e na cobaia, sendo no coelho usada a via subcutanea, e depois só na cobaia e apenas por via intramuscular. Existe uma ação patogenica irregular das amostras americanas do virus, por via subcutanea na cobaia, ação que parece constante, ou pelo menos frequente, pois SHOPE encontrou dificuldade semelhante, trabalhando

com a amostra isolada nos Estados Unidos e serviu-se então da amostra ungara, que lhe remetera o proprio AUJESZKY. Nossos ensaios mostraram que a via intramuscular na cobaia, é bastante sevéra, produsindo regularmente a infecção mesmo em diluições altas, e presta-se a estas experiencias, resolvendo bem a dificuldade. Nossa rotina ficou fixada com o uso da via intramuscular, na face interna da coxa, na cobaia. A constancia do prurido é impressionante e facilita a leitura dos resultados.

A DLM de nossa amostra n.º 3, procedente de Jardinopolis, para o coelho e por via subcutanea, é dada por 1 cc. de uma emulsão de virus a 1 p. 5.000, correspondendo a 0.0001 gr. Para a cobaia, por via intramuscular, a DLM é dada por 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 2.500, correspondendo a 0.0002 gr. Deste modo, a dose de virus usada, 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 10, contem, aproximadamente, 500 DLM para o coelho, por via subcutanea e 250 DLM para a cobaia, por via intramuscular.

Os animais inoculados são sempre observados durante um longo periodo para surpreender incubações fora da regra, embora o periodo de incubação mais longo registrado por REMLINGER e BAYLLY, seja o de 13 dias.

* * *

Em uma propriedade situada em Laranjal, neste Estado, em Janeiro de 1937, verificou-se a ocorrencia de um fóco da doença de Aujeszky. A série foi de 9 casos em bovinos, no espaço de 15-20 dias. Foi possivel surpreender o inicio discreto dos sintomas de ligeira inquietação e de prurido pouco intenso ainda, na base da cauda, em um caso, e a série de sintomas já graves e alarmantes, em outro caso. O virus foi aí isolado da medula lombar de uma vaca, o material de cerebro deste mesmo animal, tendo sido inoculado no coelho, por via cerebral, com resultados negativos. A observação relativa a este caso, está referida em trabalho anterior onde estudamos a ausencia do virus no cerebro e a rotina de colheita de material para isolamento do virus.

Os dados reunidos neste fóco, como em varios outros, serão oportunamente examinados de modo especial, e coincidem em suas linhas gerais, de modo muito significativo, com os dados reunidos por SHOPE no fóco norte americano.

Apenas um lote de 25 leitões mantinha contacto frequente com o gado bovino em cujo efetivo os casos da doença se verificaram. Dôse desses leitões foram separados, sendo alguns autopsiados. Destes dôse, nove puderam ser examinados do ponto de vista da prova de proteção dos sôros em coelhos e cobaias, o que representa aproximadamente, um

terço do efetivo que nos interessava. Os ensaios foram realisados cerca de 4 mêses depois da ocorrencia do fóco, mas o contacto dos leitões com a criação havia sido praticamente cortado quando o fóco foi verificado e os animais removidos para o laboratorio pouco depois.

Os resultados foram surpreendentes pela sua regularidade e pelo numero de provas positivas. Todos estes nove sôros mostraram anticorpos neutralizantes do virus, não só em ensaios no coelho como na cobaia. Os resultados positivos no coelho foram obtidos com 1 cc. de sôro para 1 cc. de virus. Com 0.2 cc. os sôros nenhuma proteção ofereceram para o coelho. Na cobaia os resultados foram positivos, em presença da mesma quantidade de virus, com 1 cc. e com 0.5 cc. de sôro. Sôros de porcos normais, nas mesmas doses, servindo de controle, não revelaram ação alguma neutralizante.

Confrontando estes resultados com os que se encontram na literatura, pode-se concluir que os porcos em questão, passaram por uma previa infecção, dada pelo virus da doença de Aujeszky, resistindo a essa infecção e conservando anticorpos especificos no sôro.

Depois desta primeira série, foram examinados 4 sôros de porcos, provenientes de um fóco da doença em Pirajú, 10 sôros provenientes de outro fóco em Cravinhos e 9 sôros de um ultimo fóco em Gironda. Estes 19 ultimos foram experimentados apenas em cobaias, sendo a mesma quantidade de virus, 1 cc. de uma emulsão a 1 p. 10, neutralizada por 1 cc. - 0.5 - e mesmo 0.1 cc. de sôros desses porcos.

Existe uma diferença de comportamento, destas misturas virus-sôro, no coelho e na cobaia, que conforme referimos, é assinalada em trabalho de Shope e mais tarde particularmente estudada por Sabin (1935). Examinaremos oportunamente esta questão.

Resulta sem duvida, destes ensaios, que os sôros dos suinos colhidos de animais procedentes dos fócos em que aparece a doença nos bovinos, revelam de modo nitido, a presença de anticorpos neutralizantes do virus da doença de Aujeszky, em quantidades bem evidentes pelas provas realizadas, neutralizando na dose de 1 cc. de sôro, até 500 DLM para o coelho e cerca de 2.500 DLM para a cobaia. A presença desses anticorpos traduz previa infecção pelo virus e daí decorre a noção de que a doença, embora sob forma benigna, existe atingindo o porco e deve ser mesmo, mais ou menos frequente. Como se vê, dos 32 sôros examinados, 30 revelaram a presença de anticorpos especificos.

E' desnecessario acentuar a importancia pratica destas verificações. Elas tendem a mostrar um possivel papel importante do porco,

como portador de virus e como fonte de infecção para os bovinos e para as outras especies sensiveis a infecção sob a forma de doença clinicamente bem caracterizada e mortal.

As observações reunidas nos fócos mostram que é possivel ocorrencia de uma infecção do porco, posterior, secundaria e mesmo decorrente da infecção dos bovinos, pela voracidade conhecida com que os primeiros devoram fragmentos de organs ou da carcassa de bovinos que sucumbem á doença. Mas estas mesmas observações não contrarriam a possibilidade de surgir de inicio, uma infecção do porco e de seu papel como reservatorio de virus e fonte de contagio para os bovinos.

* * *

Os dados aqui reunidos, que serão completados por outras observações e pelo estudo de outros aspectos interessantes, colhidos de inqueritos locais, conduzidos em varios fócos, — autorizam desde já as seguintes conclusões.

Em 4 fócos diferentes da doença de Aujeszky em bovinos, no Estado de S. Paulo e de 32 sôros de porcos examinados, submetidos á prova de proteção no coelho ou na cobaia, — 28 sôros revelaram de modo nitido, a presença de anticorpos neutralizantes do virus da mesma doença.

Considerando pelos dados que a literatura registra, que os anticorpos em questão são rigorosamente especificos, conclue-se que os porcos cujos sôros neutralizaram o virus, passaram por uma infecção produzida pelo virus da doença de Aujeszky, resistindo a esta infecção, que deve ser de regra, mais ou menos benigna, passando despercebida e ignorada.

A infecção dada pelo virus de Aujeszky existe nos suinos no nosso meio. O interesse desta verificação é que ela tende a mostrar um papel importante do porco como portador de virus no nosso meio e nos fócos da doença, e como fonte de infecção para os bovinos e para as outras especies sensiveis á infecção clinicamente bem caracterizada e mortal.

E' possivel a ocorrencia de uma infecção do porco como decorrente da doença dos bovinos, pela voracidade conhecida com que os suinos devoram, ás vezes, fragmentos de cadaveres de bovinos que morrem da doença.

As observações reunidas fasem pensar que de regra existe antes uma infecção previa do porco e daí decorre o seu papel como portador de virus e disseminador da doença.

## NEUTRALIZING ANTIBODIES OF THE VIRUS OF AUJESZKY'S DISEASE IN THE BLOOD-SERUM OF SWINE IN BRAZIL


### *Abstract*

SHOPE *demonstrated, in 1931, the presence of virus-neutralizing antibodies in the serum of hogs that recovered from Aujeszky's disease. In 1935, the same worker, taking as a criterion of a previous infection by the virus the presence of such antibodies, found that pseudorabies is a highly prevalent, unrecognized disease in some regions in the U. S. A.*

*The disease appears sparsely but with relative frequency in brazilian bovines. The brazilian focus is constituted by the region comprising the whole state of São Paulo, south of Minas Gerais, south of Goiaz and the north of Paraná. It was thought interesting to know the focuses soon after the appearance of the disease in bovines. 32 serums were examined from 4 different focuses and 30 positive results were obtained.*

*In the first focus — with 12 cases of the disease in bovines — one lot only, of 25 young hogs, were in contact with cattle. Nine of these hogs were examined, showing positive results in rabbits and guinea pigs.*

*Of 23 serums examined from the 3 other focuses, 21 were also positive in Guinea pigs through intramuscular inoculation.*

*The MLD of the strain of the virus used through subcutaneous route in rabbits was 1 x 5.000 and 1 x 2.500 through intramuscular route in guinea pigs. The last 19 serums in a dose of 0.5 and 0.1 neutralized 100 mg. of virus, corresponding to 1 cc. emulsion (1 to 10) in guinea pigs experiments.*

*The conclusion is that hogs, in the focuses of bovine infection, have been subject to and recovered from an infection of Aujeszky's virus, keeping neutralizing antibodies in the serum.*

*The infection exists in our country, affects hogs and seems to be very frequent in focuses of bovine disease.*

*This is the first demonstration in Brazil of the infection in hogs, having been accomplished by the proof of the presence of antibodies in the serum.*

*The chief interest of these researches is to demonstrate the role of the hogs as virus carrier and source of bovine infection.*

*The data obtained in local inquiries, agreeing in general lines with* SHOPE'S *results in the north american focus, will be published later.*


———o———

Vol. 10 — Art. 22 Dezembro de 1939

# DUAS NOVAS ESPÉCIES DE COCCÍDEOS DO BRASIL (HOMOPTERA - COCCOIDEA)

POR

H. S. Lepage

Do Instituto Biologico de S. Paulo

Com 19 figuras no texto

Em 1921 MacGillivray criou o gênero *Niveaspis,* tendo como tipo a espécie *Lepidosaphes argentata* (Ckll.). O Professor G. F. Ferris, em seu magnífico trabalho «Atlas of the Scale Insects of North America», estabeleceu o novo gênero *Lyraspis,* tendo como tipo o *Lepidosaphes ilicis* (Hoke). Recentemente, em carta, Ferris comunicou-me que, tendo examinado em Washington os tipos de *L. argentata*, chegou à conclusão de que o seu gênero *Lyraspis* não tinha razão de existência, pois o considerava sinônimo de *Niveaspis* MacG.

Assim sendo, a minha espécie *Chionaspis hempeli,* que Ferris havia transferido para *Lyraspis,* passará a denominar-se *Niveaspis hempeli* (Lepage).

Em 1938 encontrei em Santos, sôbre diversas plantas silvestres, um diaspidídeo bastante semelhante a *Niveaspis hempeli* (Lepage) e a *Niveaspis townsendiana* (Gkll.), das quais difere pela presença de sete grandes, «two-barred» glândulas marginais, ausência de glândulas ventrais submarginais, dimensões, etc.

## *Niveaspis insularis,* sp. n. (Figs. 1-6).

Escudo da fêmea adulta de côr branco-assetinada, longo, estreito, de lados paralelos, recurvado em fórma de vírgula, com as exúvias larvais, que são de côr alaranjada na extremidade anterior. Mede o escudo feminino 2 a 3,5 milímetros de comprimento por 0,2 a 0,3 milímetros de largura. Na exúvia larval notam-se vestígios das antenas. Observa-se no escudo feminino a presença de um escudo ventral delicadíssimo. O escudo masculino tem o mesmo aspécto, côr e textura do feminino, medindo 1 a 1,5 milímetros de comprimento, com a exúvia terminal. A fêmea adulta é alongada, de côr alaranjada, tendo metade ou mais do corpo constituido pela cabeça e segmentos torácicos. O seu comprimento é de 1,5 a 2 milímetros. Antenas representadas por simples tubérculos com pêlos. Entre as antenas, nota-se a presença de um grande e bem definido lóbulo, que é encontrado nas demais espécies dêste gênero. Estígmas torácicos situados, os anteriores, dos lados do aparelho bucal, e os posteriores, na extremidade do têrço médio do corpo. *Pygidium* arredondado, apresentando dois pares de lóbulos bem definidos. O par mediano constituido por lóbulos arredondados, não zygóticos; o segundo par tambem bem desenvolvido, bilobado, isto é, dividido em duas partes por uma incisão, sendo a parte maior a mais próxima da linha mediana. O *pygidium* apresenta na margem sete grandes glândulas «two-barred»,

dispostas da maneira característica dos diaspidídeos. Ha uma entre o primeiro e o segundo par de lóbulos e as seis restantes em série após o segundo par de lóbulos. Não encontramos glândulas submarginais ventrais das mesmas dimensões que as marginais no 6.º e 7.º segmentos abdominais como acontece em *Niveaspis hempeli*. Do lado ventral encontramos dois pares de áreas esclerosadas em fórma de «V» invertido, cujo conjunto tem um aspécto de lira, o que motivou o nome de *Lyraspis*, dado por FERRIS. Glândulas dorsais do *pygidium* presentes, ocorrendo em grupos bem definidos. Ânus redondo. Vulva situada entre o orifício anal e a extremidade do *pygidium*, mais próximo dêste. Não ha discos perivulvares. Ha dois pares de «gland-spines», um entre os lóbulos medianos e o 2.º par e o outro logo após o 2.º par. Ha pequenos espinhos, situados 1 de cada lado externo dos lóbulos medianos, dois em cada segundo lóbulo, sendo um na incisão e outro na face externa e os 4 restantes espalhados após o 2.º par.

Macho adulto bem desenvolvido, bastante semelhante ao de *Niveaspis hempeli*.

*Habitat* — Encontrado em Santos, em ramos e fôlhas de diversas plantas silvestres de diferentes famílias botânicas, nos arredores da Praia do José Menino, Cidade de Santos e Ilha Porchat.

Material típico — Incorporado às coleções entomológicas do Instituto Biologico de S. Paulo, sob número 1.931 e Instituto Oswaldo Cruz.

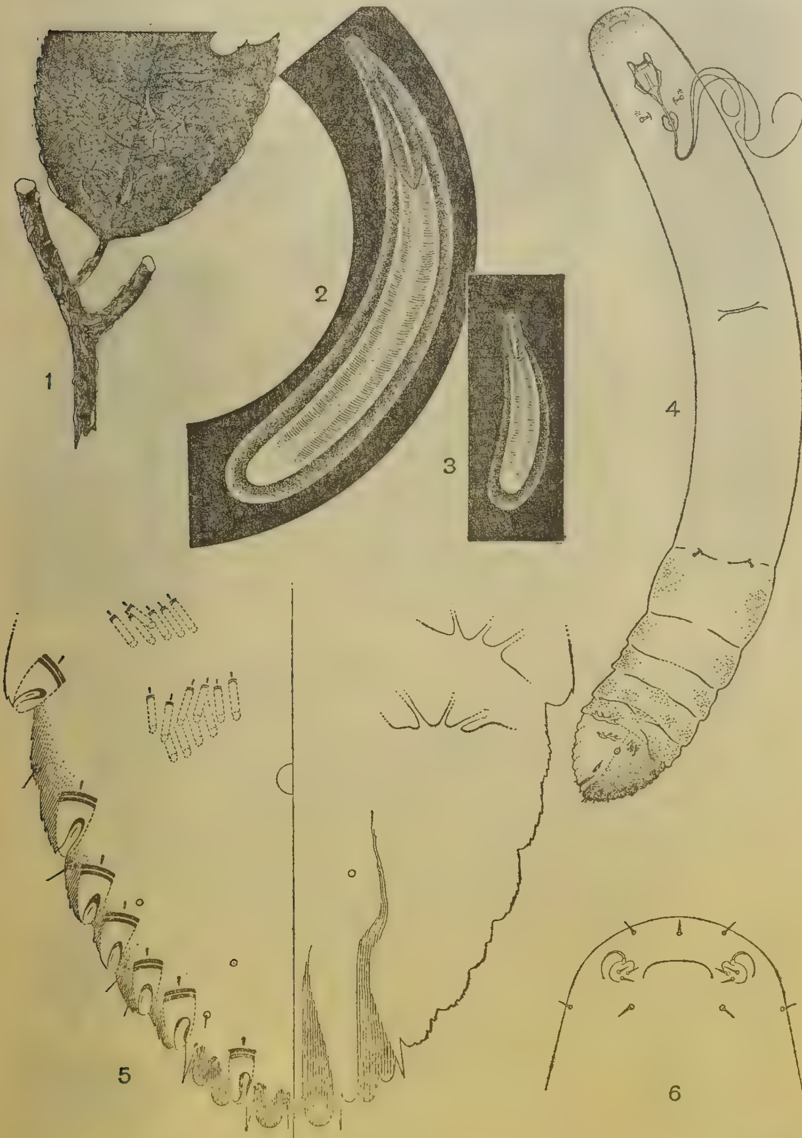
Ha cêrca de um ano, examinando, no desempenho de minhas funções, uma remessa de orquidáceas, notei, numa planta, *Encyclia* sp., raros escudos de coccídeos interessantes. Adquirindo a planta para estudo dos coccídeos encontrados, verifiquei tratar-se de uma espécie do gênero *Conchaspis*, gênero do qual foi encontrada em nosso país a maioria das espécies.

Esta espécie aproxima-se de *Conchaspis angraeci* (COCKERELL), da qual se diferencia pelas dimensões, caractéres do pseudo-pygidium, número e posição das glândulas abdominais, etc..

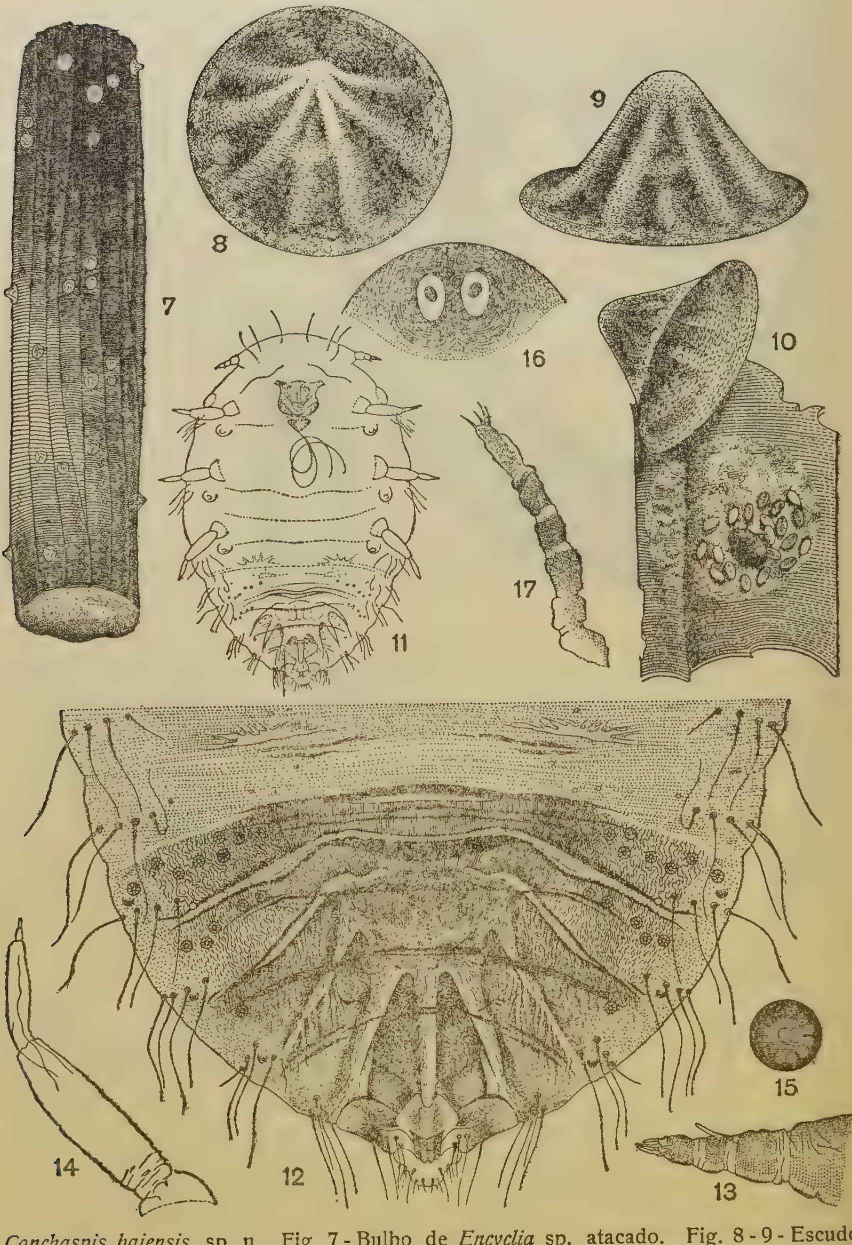
### *Conchaspis baiensis*, sp. n. (Figs. 7-17).

Escudo feminino de côr clara, branco-acinzentada, opaco, mais ou menos circular, com o centro elevado, o que lhe dá uma fórma cônica. Partindo do vértice do escudo, encontramos 4 a 8 carênas radiais que são invisiveis nas proximidades do vértice e pouco perceptiveis na perifería do escudo. Nos escudos nóvos estas carênas são nítidas, enquanto nos velhos quasi desaparecem. Muitas vêzes encontramos uma carêna transversal ligando duas carênas radiais, próximo do meio da altura do escudo. Brancos quando nóvos, os escudos tornam-se sujos, acinzentados, de aspécto feltrôso. O escudo feminino mede 0,64 a 90 milímetros de comprimento por 0,75 a 1,60 de largura e por 0,48 a 0,90 de altura. O escudo ventral é branco, delicado e adére à planta hospedeira.

A fêmea adulta é de côr avermelhada, de fórma oval, deprimida e com a segmentação nítida. O corpo é mais largo na região protorácica e as margens laterais convergem para a extremidade caudal. Cabeça arredondada

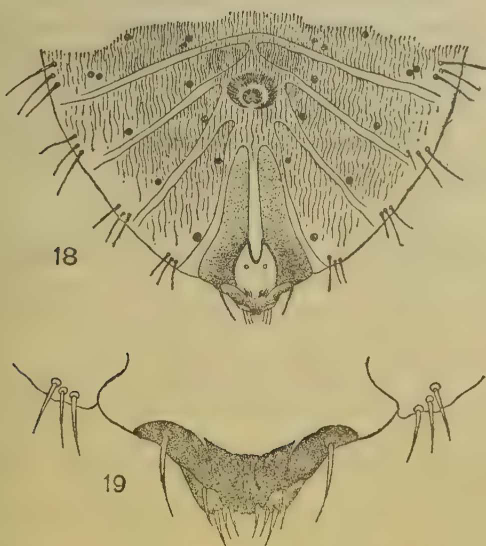



*Niveaspis insularis*, sp. n. Fig. 1 - Galho e fôlha atacados. Fig. 2 - Escudo feminino muito aumentado. Fig. 3 - Escudo masculino muito aumentado. Fig. 4 - Fêmea adulta muito aumentada. Fig. 5 - Pygidium da fêmea adulta muito aumentado. Fig. 6 - Cabeça da fêmea adulta muito aumentada. (Ribeiro Silva, del.)




*Conchaspis baiensis,* sp. n. Fig. 7 - Bulbo de *Encyclia* sp. atacado. Fig. 8 - 9 - Escudo feminino visto de cima e de perfil. Fig. 10 - *Idem,* levantado, mostrando ovos, larvas e fêmea adulta. Fig. 11 - Fêmea adulta. Fig. 12 - Extremidade abdominal da fêmea adulta. Fig. 13 - Antena. Fig. 14 - Perna. Fig. 15 - Glandula multilocular de fêmea adulta. Fig. 16 - Detalhe da face dorsal da cabeça. Fig. 17 - Antena da larva. (Ribeiro Silva, del.)

com as antenas nas margens laterais. Antenas com 4 segmentos, cujas dimensões são bastante variaveis entre si. Nos dois segmentos terminais das antenas encontramos respectivamente um a dois e seis a séte pêlos. Os olhos, localizados nas margens da cabeça, abaixo das antenas, são globósos e salientes. Aparelho bucal bastante desenvolvido, com *rostrum* bi-articulado. Ainda na cabeça, encontramos entre as antênas 8 longos pêlos, dispostos 4 de cada lado da linha mediana, afastados um do outro e formando um quadrilátero de cada lado da linha mediana. As pernas são curtas, sub-iguais, e articulam-se próximo às margens do corpo. Suturas tíbio-tarsais obsolêtas. Proximo à inserção das pernas encontramos os estígmas traqueais, os protorácicos e mesotorácicos bem desenvolvidos e os metatorácicos menos desenvolvidos. Todos os estígmas estão co-




Figs. 18 - 19 - *Conchaspis angraeci* (CKLL.), segundo Newstead — Aspétos da extremidade abdominal.

locados posteriormente à inserção das pernas. Abdómen arredondado, apresentando os 4 últimos segmentos e formando uma espécie de *pseudopygidium*. Não ha propriamente a fusão dos segmentos abdominais, porém êles são mais quitinizados e apresentam-se sob a fórma de placas triangulares, com o angulo mais agudo voltado para a linha mediana. O segmento caudal do abdómen apresenta 4 espinhos curtos terminais e 2 maiores laterais. Na face ventral dos segmentos abdominais, encontramos nos 3.º, 4.º e 5.º segmentos glândulas dermais, multiloculares, dispostas em número de 6 a 10, no 3.º segmento; 4 a 6, no 4.º segmento; e 1 a 3, no 5.º segmento. Estas glândulas apresentam geralmente 13 lóculos. Em *C. angraeci*, estas glândulas estão espalhadas por todos os segmentos abdominais e em número mais reduzido. Na face dorsal dos segmentos abdominais encontramos em cada um, quatro longos pêlos glân-

dulares. Próximo à inserção dos pêlos glandulares, encontramos, nas margens dos segmentos, pequenos e pouco perceptiveis tubérculos mamiliformes, mais visiveis nos segmentos 3.º, 4.º e 5.º. A vulva acha-se situada na confluência das placas triangulares que constituem os segmentos terminais do abdómen.

As larvas apresentam o mesmo aspécto das fêmeas adultas, com exceção das dimensões, que são muito mais reduzidas. Suas antenas têm seis segmentos; existem as suturas tíbio-tarsais. Quando levantamos um escudo feminino, encontramos geralmente óvos, larvas e uma fêmea adulta. A fêmea deposita os óvos, que são de côr rósea, debaixo do escudo.

Não encontramos machos.

*Habitat* — Encontrada pelo autor em um exemplar de *Encyclia* sp., procedente da Baía, em 17 de Novembro de 1938.

Material típico — Incorporado às coleções entomológicas do Instituto Biologico de S. Paulo, sob número 1.972, e do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

## TWO NEW SPECIES OF BRAZILIAN COCCIDAE
### (HOMOPTERA - COCCOIDEA)

*Abstract*

*In the present paper, the following two species have been described as new to science: Niveaspis insularis, taken at Santos in the State of S. Paulo, and Conchaspis baiensis, from Baía, Brazil.*

## BIBLIOGRAFIA

COCKERELL, T. D. A. — 1893 — Coccidae or Scale Insects — *Bull. Bot. Dept. Jamaica,* p. 9.

FERRIS, G. F. — 1937 — Atlas of the Scale Insects of North America. Stanford University.

HEMPEL, A. — 1900 — As coccidas brazileiras. *Rev. Mus. Paulista,* S. Paulo, **4,** 365-537.

LEPAGE, H. S. — 1935 — Uma especie nova do genero Chionaspis. *Arq. Inst. Biol.,* S. Paulo, **6,** 167-170.

LEPAGE, H. S. — 1938 — Catálogo dos Coccídeos do Brasil — *Rev. Mus. Paulista,* S. Paulo, **23,** 327-491.

MACGILLIVRAY — 1921 — The Coccidae. Urbana, III., Scarab Co.

NEWSTEAD, R. — 1903 — Monograph of the Coccidae of the British Isles. London, Ray Society. **2,** 1-5.

---o---

Vol. 10 — Supl. Dezembro de 1939

# ANIMAIS CAVADORES DA PRÁIA ARENOSA
## (Crust.: Ocypodidae; Insecta: Gryllotalpidae)

POR

P. Sawaya

Do Departamento de Zoologia da Universidade de S. Paulo

Com as estampas 39-40

Entre os animais que constituem a população habitual das práias arenosas, inumeros são os que apresentam importancia geológica e económica. Afòra os habitantes eventuais do litoral que alí permanecem por tempo mais ou menos longo, dependendo a sua demóra do fluxo das marés, muitos outros se encontram, cujo «habitat» normal é a faixa litoreana, chamada «zona da práia» («Uferzone» — KELLER 1895, p. 180) e que, em regra, são cavadores, i. é, enterram-se na areia ou nela perfuram galerías muitas vezes de extensão consideravel, onde passam a maior parte do dia ou da noite. Dentre os que apresentam normalmente esse costume, a grande maioria se encontra entre os *Arthropoda,* predominando na práia arenosa do mar, como tais, os Crustaceos.

Não poucas são as referências dos AA. sobre o modo de vida desses animais. Já desde BOSC, na reedição de DESMAREST (1830, p. 240 e seg.), são descrítos aspétos interessantes de algumas fórmas dessas zonas. Ultimamente, porém, dada a importancia tanto geológica como económica que vários animais cavadores vêm apresentando, nota-se uma acentuação das pesquisas sobre a sua ecologia, por parte especialmente de AA. japonezes. Daí a razão da presente nota, na qual apenas pretendo indicar aspétos que julguei dignos de menção relativamente ao comportamento de algumas *Ocypodidae* e *Gryllotalpidae,* por mim observadas no mês de Outubro de 1938, na práia da Enseada, em Guarujá.

E' fáto geralmente conhecido que muitas práias, em particular as das regiões temperadas, constituem curioso biotópo, mostrando habitualmente perfurações numerosas determinadas por Crustaceos que nelas demoram geralmente durante o dia, saindo á tardinha e á noite á cata de alimento.

Na Enseada, já referída, encontrei cerca de cincoenta desses buracos, espalhados numa zona bastante extensa, no limite da maré enchente e sempre na areia sêca. Os maiores tinham cerca de 5 cms. e os menores cerca de 2 cms. de diâmetro. Os orificios em geral apresentam o bordo de contorno ovalar, com uma das extremida-

des mais aguda. O rebordo obtuso aparece áspero, guarnecido de pequenas saliências formadas por pelotinhas de areia alí aderentes, e o agudo, ao contrário, é liso, indicando o lado pelo qual o animal penetrava no buraco (Estampa 39, fig. *A*). Dessa extremidade aguda extende-se exteriormente uma larga superficie triangular, de base oposta ao orifício, muito bem distínta do restante da práia, por possuir a areia mais clara, revolvida e coalhada de bolinhas duras, e provída de numerosissimas marcas lineares, características das impressões deïxadas pelas patas ambulatorias dos Crustaceos (Estampa 39, figs. *A* e *C*). Essa superfície triangular, sempre muito evidente, achava-se dirigida com frequencia para o lado do mar, mais raro para os lados laterais, e nunca para a face oposta ao oceâno. Os orifícios menores (Fig. *B*) são acompanhados de uma superficie triangular menor e constituida de pequenas pelotas de areia, sempre bem distinguiveis do restante da práia, mas com disposição idêntica á dos buracos maiores. E' de presumir que as excursões de hospedes de tais cavidades, como é natural, se dêem com frequência para a agua, menos para a zona da práia externa, e quasi nunca para o continente. Todos os buracos vistos por mim, apresentavam o aspéto acima referído, sendo consideravel o seu número; a sua topografía, porém, não obedecia a nenhuma sistematização. Grandes, médios e pequenos disseminavam-se por toda a práia, alternando-se, ás vezes, regiões em que os grupos eram mais densos (Estampa 40, fig. *D*) com as em que eles eram menos numerosos. Todos os orifícios dão entrada a um canal cilíndrico de paredes bastante lisas, e de diâmetro uniforme em toda a extensão visível. De direção sempre oblíqua, esses canais se aprofundam no sólo, sendo perceptiveis até cerca de 20 cms. do seu trajéto.

De alguns vi saírem, á hora crepuscular e á noite, vários crustaceos, correndo rapidamente em direção ao mar ou procurando novamente o buraco logo que percebiam a nossa presença. Irritados, os animais paravam elevando a pinça numa atitude de defesa. Momentos após, dirigiam-se aceleradamente para as suas tócas. Recolhi três exemplares, todos machos, sendo um adulto e dois jovens. Foi-me possivel determiná-los no laboratório, reconhecendo-os como *Ocypoda albicans* Bosc, denominados naquela região pelo nome de Siripadóca.

Numerosissimas são as refêrencias bibliográficas aos hábitos e costumes das *Ocypodidae*. Já Bosc (l. c., p. 241) os assinalou aos milhares nas Carolinas, na práia ou nos regatos nos quais se eleva a maré. Êste mesmo A. (l. c. p. 242) descreve com precisão o comportamento desses *Decapoda* quando deles se aproxima uma pessoa ou outro animal: «ils redressent leur grosse pince, la présentent en avant,

semblent le defier au combat, et se sauvent en courant de côté, mais conservant toujours la même position».

A disposição peculiar das suas brânquias, alojadas na cavidade do corpo; a abertura branquial externa localizada entre os 3. e 4. toracópodos, guarnecida de pêlos, e pela qual penetra a água, que, retida na cavidade branquial, assegura a humidade necessária á respiração, atraíram a atenção de muitos investigadores, particularmente de FRITZ MÜLLER (1868, pp. 215/216), o qual aproveitou o resultado de suas antigas e conhecidas observações, como argumento em favor da teoría de DARWIN. Como observou este A., tais crustaceos da arêia (*Ocypoda*) não pódem manter-se vivos, nem um dia, na água; uma vez nela, muito cêdo perdem os movimentos e tornam-se fracos (*). Este mesmo A. (1929, p. 48) informava, por carta escrita em 1863 a AGASSIZ, que vira escorrer água pela abertura branquial protegida com densos pêlos.

Mais recentemente, além das referências de BALSS (1926, p. 827), de RATHBUN (1918, p. 369) e de muitos outros, várias espécies deste genero, principalmente *ceratophthalma*, e outras pertencentes a *Ilyoplax* e *Uca*, foram objéto de interessantes investigações por parte de HAYASAKA e de TAKAHADI (1935).

O primeiro desses AA. figúra (1935, fig. 3, p. 101) uma região da práia de Tausui, a noroeste de Taitoku, onde se notam alguns orifícios dos canais feitos por *Ilyoplax formosensis*, os quais se assemelham até certo ponto aos de *Ocypoda albicans* de Guarujá. Uma diferença bem nitida porém, verifica-se na particularidade que *Ilyoplax* possúe de fazer bolinhas redôndas, de arêia, numerosissimas e espalhadas densamente ao redor dos buracos, juncando a práia, como se acha muito bem representado na figura citada. Tal propriedade não observei em Ocypoda e daí o aspéto bem diferente quando se comparam as minhas fotografias com a de HAYASAKA. Por outro lado, TAKAHASI (l. c., p. 79) ao estudar a distribuição ecológica das *Ocypodidae*, determinou que as mais abundantes são dos gêneros *Scopimera* e *Iloyplax*, chegando a contar respétivamente em cada m², 30-40 indivíduos do primeiro e 70-80 do segundo. A seguir vêm *Ocypoda* e *Uca* com 2-3 e 20-30 especímens de idêntica superfície. Opina o referido A. que tal divergencia se explicaria por serem os representantes daqueles gêneros de menor tamanho (80-12 mm e 6-8 mm de largura de carapaça) e os últimos muito maiores (30-45 mm e 30-50 mm), sendo a população maior nas espécies de tamanho menor, de limitada área de atividade, cujos membros súbsistiriam com alimentos tirados do plancton; aqueles outros (*Ocypoda* e *Uca*), porém, de corpo maior, de movimentos

(*) Já se achava em última prova este trabalho, quando consegui obter a excelente monografia de VERWEY (1930), o qual indica á p. 239 que conseguiu manter *Ocypoda ceratophtalma* vivos durante ca. de 70 horas mergulhados em agua bem arejada.

rápidos, de olhos desenvolvidos, necessitando de grande quantidade de alimentos, teriam população menor.

Repéte o referído A. (l. c., p. 81) os fátos já observados por FRITZ MÜLLER (1868 l. c.) sobre a chamada «adaptação» das *Ocypodidae*, por serem entre os animais os que alcançaram maior êxito quando se «adaptaram» ás circunstancias externas, em virtude dos seus hábitos alimentares e cavadores, da velocidade do movimento, dos olhos, da côr e do modo de vida na arêia sêca. Tratando TAKAHASI (l. c.) das particularidades da vida de *Ocypoda,* diz que éla fécha o orifício do canal de seu esconderijo na maré enchente ou quando o vento é forte. Tais singularidades nunca pude observar nos animais do mesmo gênero na práia da Enseada, onde, como disse, eram relativamente abundantes. Menciona ainda o mesmo A. (l. c.) que, quando o buraco é cavado no alto, tem uma profundidade que atinge o nivel do mar; não se comunicam eles entre si, mas póde acontecer algumas vezes que um Siripadóca tome o esconderijo do outro. Alguns dos canais chegam a atingir 2 m. de profundidade, mostrando-se encurvados e ramificados. Tal conformação pôde ser muito bem observada graças ao artifício usado por TAKAHASI (l. c., t. 6, fig. 4) que obteve o negativo dos canais com modelos de gesso. HAYASAKA (l. c., p. 101) usando identico método, conseguiu também bonitos moldes com os quais sugére relações de semelhança entre os buracos encontrados no Cretaceo e os vistos em Tausui.

Ao que me consta, as *Ocypoda* não são comestiveis, pelo menos em Guarujá. Os pescadores usam-nas como isca. Parece-me interessante mencionar que o mesmo hábito é normal entre os aborigenes da baía «Princess Charlotte» ao norte da Queensland, na Austrália, como é apontado e figurado por HALE e TINDALE (1933, p. 109).

*
* *

Além dos buracos cavados por *Ocypoda,* a práia apresentava outros acidentes que logo também chamaram a minha atenção. Na zona da arêia sêca e fôfa, notavam-se elevações de pequena altura (2-4 cms.), de comprimento variável de 20 a 100 cms., largura de 3-4 cms. e caraterisadas pela trajetória sinuosa, como bem se póde notar nas figs. *E* e *F* da estampa 40. Tal sinuosidade se acentuava por curvas mais fechadas, geralmente numa das extremidades onde, em regra, se dava uma dicotomisação. A eminência de arêia apresentava-se fendida (Fig. *E*) em toda a extensão, sendo assim constituida de um agregado de numerosissimas superfícies de contôrno muito irregular. Com o auxílio de um estilete ou mesmo com os dedos, abrí tais elevações e deparei, em todas élas, com um canal de diâmetro de 1 cm.

no máximo (Fig. *F*). Como a superfície interna era lisa em toda a longúra, dava a impressão, á primeira vista, de ter sido cavada por vermes cilíndricos. Como é natural, o interesse maior foi o de encontrar o animal causador de tais galerías localisadas sempre á flôr do sólo. Nenhuma vez pude notar orifícios de entrada ou saída. Em muitas galerías abertas achei, como faúna secundária, vários exemplares de *Forficulidae* e de *Oligochaeta.* Depois de abertos todos os canais encontrados, tive a surpresa, ao romper o último, de verificar, na extremidade opósta ao mar, enterrado na arêia ainda húmida, um exemplar de uma *Gryllotalpa.* Achava-se éla com as patas cavadoras afundadas no sólo e com o dorso do abdomen juxtaposto ao této da galería. A presença do animal, a meu vêr, veio justificar o aspéto externo das elevações. Penetrando na arêia ainda molhada, o animal vai cavando o estreito túnel e fórça a superfície superior, a qual se fende por ser relativamente muito delgada; depois de sêcos, os torrões de arêia afastam-se ainda mais (Fig. *E*). Provavelmente, o orifício de entrada é logo obliterado com arêia, sendo por isso invisível.

Não obstante os abundantes dados de literatúra sobre os hábitos das *Gryllotalpidae,* nos trabalhos que me foram acessiveis não ha referências á formação de tais galerías nas práias arenosas marítimas. Como é sabido, as *Gryllotalpa* são habitantes dos jardins e das zonas de plantação, e a sua ocorrencia nos lugares que acima assinalei não parece frequente.

Bem conhecida é a biologia de vários *Orthoptera* da familia das *Gryllotalpidae.* Particularmente na Europa, á vista dos grandes dânos que *Gryllotalpa gryllotalpa* L. cáusa á agricultura, a espécie tem sido objéto de acurados estudos por parte dos laboratórios, principalmente de zoologia agrícola. Assim, Conte (1928, p. 281), que teve ocasião de estudar com minúcia as várias fases da metamorfóse desta *Orthoptera,* menciona que no período invernal, para obter exemplares das Grilotalpas, necessitou escavar o terreno até cerca de 2 m. de profundidade. Nessa ocasião nunca o animal aparece na superfície. Encontram-se em maior número nos terrenos ferteis. A cópula da-se no decurso da fáse atíva, a qual naquelas regiões (Napoles) aparece no mês de Abril. Na primeira, e mais ainda, na segunda quinzena de Maio, são numerosos os ninhos com ovos, escavados em terreno firme, numa profundidade nunca superior a 20 cms. O prejuízo que o inséto causa aos agricultores, segundo os dados desse A. (l. c., p. 286), sería de 20-80 %. Muitos outros pormenores praticamente uteis encontram-se no citado trabalho de Conte, do qual poderão valer-se com muito proveito os interessados.

Á míngua de literatúra adequada e de especímens bem determinados que permitissem uma classificação do meu exemplar, pude chegar apenas á indicação precísa de que êle pertence ao gênero *Gryllotalpa*.

Em muito bôa hora, veio-me ás mãos uma excelente publicação de B. TINDALE (1928, p. 4) na qual existe uma chave para a determinação das espécies australianas. Não sem surpresa verifiquei que a minha *Gryllotalpa* (ad., ♂ comp. = 28 mm; largúra = 7 mm; pronotum = 8 mm; elitra = mm 11,5), mostra caractéres semelhantes aos de *Gryllotalpa africana* PALISOT de BEAUV., descrítos circunstanciadamente no referído trabalho de TINDALE (p. 12). A discordância geográfica, porém, e principalmente por se tratar de um único exemplar, não me autorizam a identificá-lo com a espécie africana referida. Além do mais, não obstante se ajustarem perfeitamente as medidas da *Gryllotalpa* sp. de Guarujá ás de *G. africana* indicadas por ROEPKE (1919, p. 93) e por TINDALE (l. c., p. 14), é de referir que nesta espécie a longúra das azas varía nos exemplares de uma localidade comparadas com os de outra, como foi verificado pelo primeiro destes dois AA. em material de Java e de Klaten. Afóra esta circunstância, recordo ainda que no catálogo de KIRBY (1906, p. 1) são assinalados no Brasil sómente os gêneros *Scapteriscus* e *Neocurtilla*. Á vista de tais divergencias, principalmente zoogeográficas, e da presença de caractéres bem distintos no exemplar capturado em Guarujá, mediante os quais me julgo autorizado a considerá-lo no gênero *Gryllotalpa*, prefíro nesta nota registrar apenas o achado, o qual poderá ser subsídio para os futúros estudiosos que se preocuparem com as *Gryllotalpidae* do Brasil, assúnto, a meu vêr, ainda aberto na Zoologia.

Mais recentes são os poucos trabalhos publicados entre nós sobre alguns representantes desta família, e assim mesmo com o objetívo precípuo da vulgarisação. Da literatura que me foi possivel obter, destaco as notas de MONTE (1933, p. 331) e as de BARRADAS (1936, p. 123). O primeiro cita como espécies brasileiras *Scapteriscus oxydactylus* PERTY e *Neocurtilla hexadactyla* PERTY, as quais são também as unicas mencionadas por COSTA LIMA (1936, p. 107). Muitos exemplares de *Neocurtilla hexadactyla* foram colhidos por BARRADAS no Campo de Sementes de Fumo em Tracuateua. Infelizmente, as suas figuras e descrição não permitiram uma comparação com o especímen de Guarujá. Lembro, de passagem, que *N. hexadactyla*, como é indicada e figurada por esse A. (l. c., p. 127), cava galerías no sólo húmido, menos sinuosas e mais longas que as vistas por mim na Enseada. Tanto *N. hexadactyla* como *S. oxydactylus* são conhecidos entre nós por «paquinhas», «grilo toupeira», e constituem agente nocivo ás plantações, principalmente de tabáco.

Comparando o meu achado com a espécie européa (CONTE, l. c.), verifica-se que, enquanto esta última habitualmente vive no sólo (até 2 m. de profundidade) e é hospede dos lugáres adubados, a de Guarujá foi encontrada quasi á flôr da terra, e em local relativamente sêco. As galerias examinadas nunca se afundavam além de 5 cms., e jaziam na práia arenosa fôfa. Com *Gryllotalpa africana,* porém, ha maior concordância de hábitos. Assim, segundo refére TINDALE (l. c., p. 15), os adultos desta espécie vivem em galerías no subsólo, habitualmente em terreno arenoso próximo da água; são omnívoros, cavando entre as raizes das plantas para comerem minhócas e insétos, o que em parte se ajusta com o que observei na Enseada, com *Gryllotalpa* sp.

Em resumo, a faixa litoranea acima referída constitúe um interessante biotópo, no qual tive oportunidade de observar duas espécies de animais cavadores. Se considerarmos com HESSE (1924, p. 28) como animais aéreos não sómente os voadores (Insétos, Aves, Morcêgos), mas todos os que são circundados pelo ar e não pela água, e os que se movem sob o sólo, perfuram a madeira e cavam a terra sêca, poderemos enquadrar entre êles tanto as *Ocypoda* como as *Gryllotalpa*. Âmbos não prescindem do ar para manter o seu equilíbrio vital. As primeiras, apesar de pertencerem á classe dos «Branchiata», não suportam, como foi dito, a água do mar por longo tempo. Parece existir uma dependência do animal á vida aérea, não obstante ainda não se achar bem esclarecido o mecanismo da sua respiração. Embóra pertencentes a duas classes diferentes, o ambiente em que foram encontrados, tanto *Ocypoda* como *Gryllotalpa,* indíca a existência de certa afinidade entre eles. O interesse geo-paleontologico de âmbos, e o económico, principalmente do último, como ficou referído, parece-me justificar as presentes notas ecológicas, as quais poderão vir a auxiliar as pesquisas futúras sobre esses animais de tão curiósos costumes.

Agradeço ás Exmas. Familias Dr. VANNUCCI e Sr. E. MARGUTTI a gentileza de me terem facilitado a estadía na práia da Enseada, possibilitando estas observações.

## BURROWING ANIMALS OF SANDY BEACHES
### (CRUST.: OCYPODIDAE; INSECTA: GRYLLOTALPIDAE)

*Abstract*

*Several* Ocypoda albicans *BOSC were found in Enseada shore (Guarujá — São Paulo's coast) burrowing in the vast sandy beaches. The mouth of the burrow presents a large triangular surface that distinguishes it clearly from the rest of the sandy beach. The au-*

*thor refers to the oldest literature from* BOSC *to* FRITZ MÜLLER *and the recent one of the Japanese authors, v. g.* HAYASAKA *and* TAKAHASI.

*Another kind of galleries the Author found in the same sandy beach mined by Gryllotalpa sp., in considerable number. Discusses the systematics of this Orthopterous Insect and according to* TINDALE *(1928, p. 12) he finds an interesting likeness with the characters of Gryllotalpa africana.*

## BIBLIOGRAFIA


BALSS, H. — 1927 — Decapoda. KÜKENTHAL-KRUMBACH: *Handb. der Zoologie,* 3, Hälfte 1, XVI + 1158 pp. Berlin e Leipzig.

BARRADAS, H. — 1936 — Contribuição ao estudo das pragas do Tabaco. A «paquinha» [Neocurtilla hexadactyla (Perty)]. *Bol. Ministerio Agric.,* ed. Estat. Prod. Rio de Janeiro. 25, 124-136.

BOSC, A. G. — 1830 — *Manuel de l'Histoire Naturelle des Crustacés.* Ed. DESMAREST, 1, 328 pp., de Roret, Paris.

CONTE, V. — 1928 — Contributo alla Conoscenza della Gryllotalpa. (Gryllotalpa gryllotalpa L.). *Boll. Laborat. Zool. gen. agr. Portici,* Spoleto. 21, 275-301.

HALE, M. & TINDALE, N. B. — 1933 — Aborigenes of Princess Charlotte Bay, North Queensland. *Rec. South Austral. Mus.,* Adelaide. 5, 63-116.

HAYASAKA, S. — 1935 — The Burrowing Activities of certain Crabs and their geologic significance. *The Amer. Mid. Nat.,* Indiana, 16, 99-101, 2 t.

HESSE, E. — 1924 — *Tiergeographie,* XII + 613 pp. G. Fischer, Jena.

KELLER, C. — 1895 — *Das Leben des Meeres,* XVIII + 605 pp. Tauchnitz, Leipzig.

KIRBY, F. — 1906 — *A synonymic Catalogue of Orthoptera.* 2, part 1, VIII + 562 pp. London.

LIMA, A. M. DA COSTA — 1936 — *Terceiro Catalogo dos Insectos que vivem nas plantas do Brasil.* ed. Diret. Estat. Prod. Minist. de Agric., 460 pp. Rio de Janeiro.

MONTE, O. — 1933 — Combate ao Grilo-toupeira (Gryllotalpa), inimigo dos canteiros. *Chacaras e Quintais,* S. Paulo. 47, 329-332.

MÜLLER, F. — 1864 — Für DARWIN. MÖLLER, A.: FRITZ MÜLLER, *Werke, Briefe und Leben,* Text, Abt. 1, pp. 200-263. G. Fischer, Jena.

MÜLLER, F. — 1921 — Briefe und Leben, gesam. u. herausg. v. Dr. ALFRED MÖLLER, v. 2, Briefe XVII + 667 pp. G. Fischer, Jena.

RATHBUN, M. J. — 1918 — The Grapsoid Crabs of America. *Bull. 97 Smith. Inst.* United States Museum, Washington. XXII + 401 pp.

ROEPKE, W. — 1919 — Mitteilung über die javanischen Maulwurfsgrillen. *Treubia,* Java, 1, 90-97.

TAKAHASI, S. — 1935 — Ecological Notes on the Ocypodian Crabs (Ocypodidae) in Formosae. Japan. *Annot. Zoolog. Jap.,* Tokyo, 15, 78-87, t. 6.

TINDALE, N. B. — 1928 — Australian Mole-Crickets of the Family Gryllotalpidae (Orthoptera). *Rec. South Australian Museum,* Adelaide. 4, 1-42.

VERWEY, J. — 1930 — Einiges über die Biologie Ost-Indischer Mangrovekrabben. *Treubia,* Java, 12, livr. 2, pp. 167-261, t. 6-14.



Fig. *A* — Orificio do canal cavado por *Ocypoda albicans* Bosc ao lado de um pedaço de madeira e mostrando a superficie de areia clara. (Sonnar 1 : 2 f = 5 cm. diafrágma 1 : 16 ; Proxar 2 × 27).

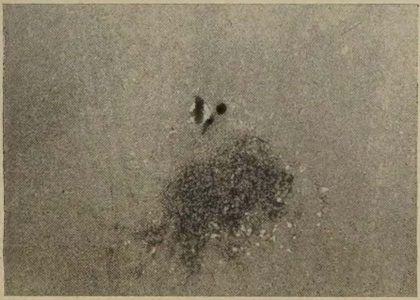


Fig. *B* — *Idem,* outro aspéto mais raro. (Sonnar 1 : 2 f = 5 cm. diafrágma 8).

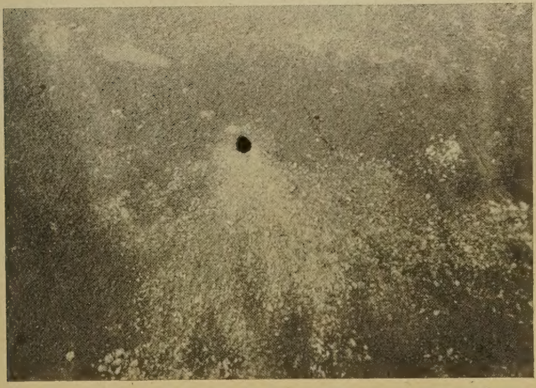


Fig. *C* — Aspéto mais comum do buraco feito por *O. albicans* (Sonnar 1 : 2 f = 5 cm., diafrágma 5,6).



Fig. *D* — Reunião de buracos cavados por *O. albicans* onde se distinguem orificios de vários diâmetros. (Sonnar 1 : 2 f = 5 cm., diafrágma 8).



Fig. *E* — Galería cavada por *Gryllotalpa* sp. (Sonnar 1 : 2 f = 5 cm., diafrágma 1 : 16, Proxar 2 X 27).

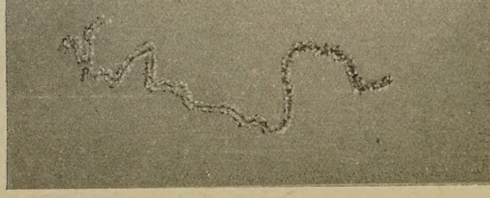


Fig. *F* — *Idem*, aberta, mostrando a trajetória sinuosa (Sonnar 1 : 2 f = 5 cm., diafrágma 5,6).

(Fotografías Contax-Zeiss, P. Sawaya)

SÃO PAULO
TIPOGRAFIA BRASIL
ROTHSCHILD LOUREIRO & CIA. LTDA.
RUA 15 NOVEMBRO, 201
1939